PRIMÄRSTRUKTUR DER HÄMOGLOBINE DES GOLDFISCHES „CARASSIUS AURATUS“ UND DES LUNGENFISCHES „LEPIDOSIREN PARADOXUS“

Karin Rodewald

1981

PRIMÄRSTRUKTUR DER HÄMOGLOBINE DES GOLDFISCHES "CARASSIUS AURATUS" UND DES LUNGENFISCHES "LEPIDOSIREN PARADOXUS"

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

Vorgelegt von Karin Rodewald
aus
München
1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Prof. Dr. G. Braunitzer

2. Referent: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.1981

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Abkürzungen	1
I.	Einleitung und Problemstellung	2
II.	Das Hämoglobin des Goldfisches	5
II.A.	Gewinnung des Hämoglobins	5
II.B.	Gewinnung des Globins	6
II.C.	Kettentrennung des Globins	6
II.D.	Sequenzanalyse der α-Ketten des Goldfisches	7
II.D.1.	Tryptische Spaltung der α-Ketten und Isolierung der Peptide	7
II.D.2.	Spaltung der ASP-PRO Bindung der α-Ketten	15
II.D.3.	Spaltung am Tryptophan der α-Ketten	15
II.D.4.	Die Sequenz der α-Ketten des Goldfisches	15
II.E.	Sequenzanalyse der ß-Ketten des Goldfisches	20
II.E.1.	Analyse der Ketten	20
II.E.2.	Spaltung der ASP-PRO Bindung und Isolierung der Peptide	20
II.E.3.	Tryptische Nachspaltung des N-terminalen Peptids aus der ASP-PRO Spaltung und Isolierung der Peptide	22
II.E.4.	Die vollständige Sequenz der ß-Ketten des Goldfisches	25
III.	Das Hämoglobin des Lungenfisches	29
III.A.	Gewinnung des Hämoglobins und des Globins. Bestimmung der Anzahl der Komponenten und der Ketten	29
III.B.	Kettentrennung des Globins	32
III.C.	Sequenzanalyse der α-Ketten des Lungenfisches	33
III.C.1.	Analyse der Ketten	33
III.C.2.	Spaltung der ASP-PRO Bindung der α-Ketten	33
III.C.3.	Spaltung am Methionin der α-Ketten	36
III.C.4.	Tryptische Spaltung der α-Ketten	37
III.C.5.	Zur Sequenz der α-Ketten des Lungenfisches	39
III.D.	Sequenzanalyse der $ß_A$-Ketten des Lungenfisches	39
III.D.1.	Analyse der intakten Ketten	39

III.D.2.	Spaltung der ASP-PRO Bindung und Isolierung der Peptide der β_A-Ketten	39
III.D.3.	Tryptische Spaltung der β_A-Ketten und Isolierung der Peptide	42
III.D.4.	Spaltung am Tryptophan	47
III.D.5.	Die Sequenz der β_A-Ketten des Lungenfisches	51
IV.	Diskussion	54
IV.A.	Homologe Zuordnung der α- und ß-Ketten des Goldfisch-Hämoglobins zu dem Human-Hämoglobin	54
IV.B.	Lungenfisch-Hämoglobin	67
IV.C.	Physiologie der Fisch-Hämoglobine	85
IV.C.1.	Bohr- und Root-Effekt	87
IV.C.2.	Kontrolle der O_2-Affinität der Fisch-Hämoglobine durch organische Phosphate	93
V.	Methoden und Material	98
V.1.	Gewinnung der Hämoglobine des Goldfisches und des Lungenfisches	98
V.2.	Gehaltsbestimmung der Hämoglobinlösung	98
V.3.	Häm-Abspaltung	99
V.4.	Disk-Gel-Elektrophorese	100
V.5.	Röhrchen-Gel-Elektrophorese im Harnstoff bei pH 3,5	101
V.6.	Platten-Gel-Elektrophorese	102
V.7.	Analytische Hochspannungselektrophorese auf Papier	103
V.8.	Präparative Hochspannungselektrophorese auf Papier	104
V.9.	Carboxymethylierung des Globins bzw. der Ketten	104
V.10.	Kettentrennung des Goldfisch-Globins	105
V.11.	Kettentrennung des Lungenfisch-Globins	105
V.12.	Chemische Spaltungen	106
V.12.a.	Sauere Hydrolyse der ASP-PRO Bindung und Isolierung der Peptide	106
V.12.b.	Spaltung am Tryptophan mit o-Jodosobensoesäure und Isolierung der Peptide	106
V.12.c.	Spaltung mit BrCN der Ketten und Isolierung der Peptide	107

V.13.	Enzymatische Spaltungen	107
V.13.a.	Tryptische Spaltung der α-Ketten des Goldfisches	107
V.13.b.	Tryptische Nachspaltung des N-terminalen Peptids (Pos.1-99) aus der ASP-PRO Spaltung der ß-Ketten des Goldfisches	108
V.13.c.	Tryptische Spaltung der α-Ketten des Lungenfisches und Isolierung der Peptide	111
V.13.d.	Tryptische Spaltung der $ß_A$-Ketten des Lungenfisches und Isolierung der Peptide	111
V.13.e.	Tryptische Nachspaltung des oxidierten α-Cores des Goldfisches zur Gewinnung des Peptids Tp11	112
V.13.f.	Spaltung des α Tp1(a+b) des Goldfisches mit Chymotrypsin und Isolierung der Peptide	112
V.14.	Auswertung der Trennungen	114
V.15.	Diskontinuierliche Absorptionsmessungen	114
V.16.	Automatische Messungen durch Ninhydrinreaktion im Technikon	114
V.17.	Entsalzung peptidhaltiger Fraktionen	115
V.18.	Leitfähigkeitsmessungen	115
V.19.	Aminosäureanalyse	115
V.20.	Tryptophan-Bestimmung durch Aminosäureanalyse	116
V.21.	Bestimmung von Cystein und Methionin durch Aminosäureanalyse	116
V.22.	Manuelle Endgruppenbestimmung	117
V.23.	Automatische Sequenzierung	117
V.24.	Identifizierung der PTH-Aminosäuren	118
	Literaturverzeichnis	120
	Zusammenfassung	126
	Lebenslauf	127

A B K Ü R Z U N G E N

A_{280}	Absorption (- lgT) bei 280
A,B,C..., 1,2,3..., NA,BC,EF,..., 1,2,3,....., Tp1,2,.....	α-helicale Bereiche der α- und ß-Ketten und die Position der Aminosäure in der betreffenden Helix interhelicale Bereiche der α- und ß-Ketten und die Position der Aminosäure in dem betreffenden Bereich Tryptisches Peptid Nr. 1, 2 nach der Numerierung in den Human-Ketten
ATP	Adenosintriphosphat
DEAE-Sephacel	Diäthylaminoäthyl-Sephacel
DPG	2,3-Diphsphoglycerat
GTP	Guanosintriphosphat
Hb	Hämoglobin
h	Stunde
IPP	Myo-Inositol-1,3,4,5,6-peutaphosphat
p50	Sauerstoffpartialdruck, bei dem das Hämoglobin zu 50% gesättigt ist
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
PTH-Aminosäuren	Phenylthiohidantoin-Aminosäuren
TPCK-Trypsin	mit N-Tosyl-L-phenylalanyl-chloromethylketon behandeltes Trypsin

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Der Vergleich der Aminosäurensequenz von Molekülen liefert Informationen über Struktur, Funktion und Evolution der Proteine. Die Sequenzstudien geben Einblick in die Evolutionsrate, die genetische Manigfaltigkeit, in die Tier- und Pflanzen Phylogenie, sowie in den molekularen Mechanismus der ökologischen Anpassung.
Eines der besonders gründlich untersuchten Proteine ist das Hämoglobin, der rote Blutfarbstoff. An diesem Protein kann die Relation Struktur - Funktion - Anpassung und die Evolution besonders gut studiert werden.
Die Anpassung wird auf der Species- und/oder Populations-Ebene vollzogen. Man kann zwischen zwei Arten der Anpassung unterscheiden:

a) Einer Physiologischen Anpassung, die auf das Individium beschränkt ist. Sie entspricht der Änderung der Organ-System-Dynamie, und der molekularen Komponente, mit dem Ergebnis: das Individium überlebt in der neuen Umgebung.
b) Einer genetischen Anpassung auf der Species- und/oder Population-Ebene.

Der resperatorische Komplex und vor allem das Hämoglobin reagieren sehr empfindlich auf alle Veränderungen innerhalb der Umgebung.Der Sauerstoff ist wesentlich für die metabolische Gewinnung der Energie. Die Verfügbarkeit des Sauerstoffs kann ein limitierender Faktor sein für die Verteilung und das Überleben der Tiere. Die Aufnahme, die interne Verteilung und Nutzung des Sauerstoffes sowie auch die Abgabe des CO_2 sind Vorgänge, die allgemein als Atmung bezeichnet werden.

<u>Die äußere (externe) Atmung</u>, ist der Austausch und Transport von O_2 und CO_2 (Gaswechsel) und findet durch lockere chemische Bindung an das Hämoglobin statt. Dieser Gaswechsel hängt von der Konzentration und O_2 - Affinität des Blutfarbstoffes ab. Die Physiologischen Eigenschafften des Hämoglobins werden beeinflußt: von der Temperatur, vom Sauerstoff, von Protonen, Salzen, von CO_2, und von organischen Phosphaten. Theoretisch kann sich eine Specie neuen respiratorischen Bedingungen mit

folgenden auf Hämoglobin bezogenen Methoden anpassen:

1) Das Hb-Molekül wird durch ein neues angepaßtes Protein ersetzt, was die Aktivierung eines neuen Gens hervorruft. Dies ist der Fall bei den Menschen oder den Vertebraten bei dem Übergang von dem foetalen oder larvalen zu adultem Leben.
2) Die Herstellung oder die Konzentrationsänderung eines oder mehreren allosterischen Effektoren, die die O_2-Affinität des Hämoglobins verändern. Diese Methode wird bei Säugern und Fischen in hypoxischen oder hyperoxischen Bedingungen beobachtet.
3) Die Hämoglobin-Konzentration wird erhöht (siehe Anpassung des Menschen an große Höhe)

Eine Untersuchung der Fischhämoglobine ist wegen ihrer speziellen Eigenschaften besonders interessant:

a) Im Gegensatz zu den landbewohnenden Tieren müssen Fische mit variablem Sauerstoff-Druck leben, d.h. ihre Hämoglobine spiegeln diese unterschiedlichen Lebensbedingungen in ihren Eigenschaften wieder.
b) Fischhämolysate zeigen mit wenigen Ausnahmen eine große Heterogenität. Diese Komponenten haben unterschiedliche funktionelle Eigenschaften, die in Verbindung mit den verschiedenen Atmungsbedingungen der Umgebung gebracht werden können.
c) Fische haben ATP und GTP als allosterischen Effektor.
d) Fische können leicht an künstliche Laborbedingungen angepaßt werden und eignen sich darum als Modelle zum Studium der Hämoglobine unter kontrollierten Versuchsbedingungen.
e) Fischhämoglobine liefern Informationen über die Strategie der Anpassung der Tiere an die variable Umgebung, in der sie gezwungen sind zu leben.
f) Das Studium der Hämoglobine der lebenden Fischfossilien könnte Erkenntnisse bringen sowohl über die Evolution als auch über die Funktionsweise der "modernen" Hämoglobine.

h) Die Hämoglobine der Fische, die fakultative oder obligatorische Luftatmer sind, können interessante Informationen liefern über die Anpassung beim Übergang von Wasser- zum Landleben, also von der Atmung im Wasser zur Luftatmung.

In dieser Arbeit wird beschrieben:
Die Sequenzierung der α und ß-Ketten der Hämoglobine des Goldfisches (Carassius auratus) und des südamerikanischen Lungenfisches (Lepidosira paradoxus). Beide Fische haben nur eine Hämoglobinkomponente. Die des Goldfisches hat dieselbe elektrophoretische Mobilität wie die der dritten Komponente des Karpfens. Der Goldfisch wurde aus der Karausche, einem sehr nahen Verwandten des Karpfens künstlich gezüchtet.
Der südamerikanische Lungenfisch ist ein "lebendes Fossil", ist aber die "modernste"Variante des australischen Lungenfisches (Neoceradotus), der wiederum dem devonischen Lungenfischfossil sehr ähnelt. Der südamerikanische Lungenfisch besitzt eine Lunge und ist ein obligatorischer Luftatmer im Gegensatz zu dem australischen Fisch, einem fakultativen Luftatmer.
Obwohl keine Röntgenanalyse eines Fisch-Hämoglobins vorliegt, sollte der Vergleich dieser Primärstrukturen mit anderen bereits sequenzierten Fisch- und Human-Ketten Information über die Unterschiede in den molekularen Eigenschaften dieser Hämoglobine bringen. Zusätzlich wird die Verbindung Struktur - Funktion dieser Proteine im Vergleich mit Human-Hämoglobin diskutiert.

II. DAS HÄMOGLOBIN DES GOLDFISCHES

II.A. Gewinnung des Hämoglobins

Alle bisher untersuchten Fischhämoglobine sind reich ans SH-Gruppen und werden leicht denaturiert. Daraus ergibt sich folgende Regel für die Aufarbeitung der Fischhämolysate: möglichst schnell und unter Kühlung arbeiten.
Die Goldfische wurden von einem Zoohändler in München bezogen. Nach der Gewinnung der Erythrocyten wurden diese mit Wasser und 1% ß-Mercaptoäthanol und 5% CCl_4 hämolysiert. Das zugefügte ß-Mercaptoäthanol soll die Oxidation der SH-Gruppen verhindern, der CCl_4 die Lipide entfernen. Die Zellreste wurden abzentrifugiert und die so entstandene Hämoglobinlösung (z.B. 3,7%) der Häm-Abspaltung unterworfen. Ausbeute: von 10 Goldfischen zwischen 10-20 cm Größe wurden 20 ml Blut bzw. 1,17 g Hämoglobin gewonnen.
Die ligandierten Formen des Hämoglobins sind stabiler und wurden zur Bestimmung der Hämoglobin-Komponenten in der Elektrophorese verwendet. Wie aus Abb. 1 ersichtlich, hat der Goldfisch (GF) nur eine Komponente (Rf=0,18), die dieselbe elektrophoretische Mobilität hat wie die dritte Komponente "C" des Karpfen (1). Im Bild 1 ist nur ein Drittel der Wanderungsstrecke wiedergegeben.

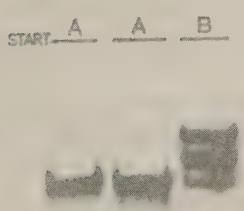


Abb. 1 Poyacrylamid-Platten-Elektrophorese vom GF Hb
A - GF-Hb
B - Karpfen-Hb

II.B. Gewinnung des Globins

Die Abspaltung der prosthetischen Gruppe wurde in salzsaurem Aceton bei -20°C durchgeführt. Die Hämoglobinlösung muß vollkommen salzfrei sein, sonst findet die Hämabspaltung nicht statt. Eine konstante Temperatur von -20°C ist ebenfalls wichtig, da unter -20°C das Globin koloidal ausfällt und nicht abzentrifugiert werden kann. Mit dieser Methode konnten Ausbeuten zwischen 60-80% an reinem nativem Globin erhalten werden.

II.C. Kettentrennung des Globins

Infolge des hohen Cystein-Gehaltes der ß-Ketten bereitete die Kettentrennung nach der Standard-Chromatographie an CM-Cellulose in 8M Harnstoff gewisse Probleme. Während die so erhaltenen ß-Ketten rein vorlagen, waren die α-Ketten mit ß-Ketten verunreinigt, was auf die Polymerisation der ß-Ketten durch Luftoxidation zurückzuführen war. Da bei den Karpfen-Globinen mit Hilfe der Luftoxidation (2) eine Trennung der Polypeptidketten erreicht werden konnte, wurde diese Methode (2) auch für die Darstellung der reinen α- und ß-Ketten des Goldfisches angewandt. Dabei wurde die Globinlösung bei pH 8,6 und in 8M Harnstoff mit Luft durchperlt und der Reaktionsansatz anschliessend über eine Sephadex G-100 Säule, die mit 50% Essigsäure äquilibriert war, chromatographiert. Wie aus Abb.2 ersichtlich ist, wurden zwei Gipfel erhalten. Der erste, größere wanderte mit der Front und enthielt polymerisierte ß-Ketten, der zweite Gipfel monomere α-Ketten. Die α-Ketten konnten wegen der fehlenden SH-Gruppen nicht polymerisieren und daher als Monomer aus der Säule eluiert werden.

Die Identität und die Reinheit der Ketten wurde durch Analysen der nativen und mit Perameisensäure oxidierten Ketten sowie auch durch manuelle Endgruppenbestimmung geprüft.

Ausbeute: Aus 204 mg Globin wurden 91 mg ß-Ketten und 90 mg α-Ketten isoliert.

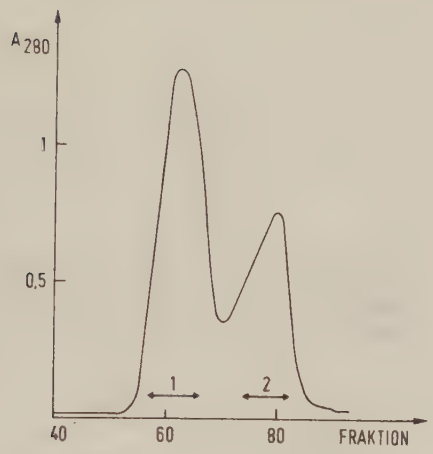


Abb 2 Chromatographie des Goldfisch-Globins nach Luftoxidation bei pH 8,6.
Säule: Sephadex G 100 (5 x 65 cm)
Puffer: 50%ige Essigsäure
Durchflußrate: 18 ml/h, Fraktionen 6 ml/20 min
Aufgetragene Menge: 200 mg

II.D. Sequenzanalyse der α-Ketten des Goldfisches

II.D.1. Tryptische Spaltung der α-Ketten und Isolierung der Peptide

Bei den α-Ketten ist die N-terminale Aminosäure blockiert. 6 µMol α-Ketten wurden vier Stunden mit TPCK-Trypsin bei pH 11 und R.T. gespalten. Anschließend wurde das α-Core bei pH 6.45 ausgefällt und abzentrifugiert. Der zweimal mit Wasser gewaschene Niederschlag wurde anschließend in 1 %o NH_3-Lösung pH 10.5 gelöst und lyophilisiert. α-Core: 24.21 mg. Die im

Sauren löslichen Peptide konnten an Sephadex G-25 vorgetrennt werden (Abb. 3).

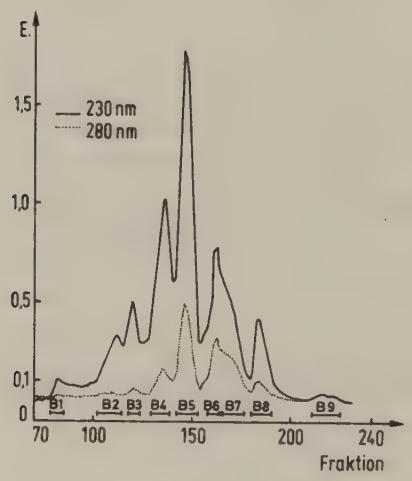


Abb 3 Vortrennung der tryptischen α-Peptide des Goldfisches
Säule: Sephadex G-25 Fine (2,5 x 145 cm)
Puffer: 0,1 M Essigsäure
Durchflußrate: 15 ml/h, Fraktionen 5 ml/20 min

Durch Hochspannungselektrophorese auf Papier wurde das Peptid-Spektrum der Gipfel festgestellt.
Die Fraktionen, die mehr als ein Peptid enthielten, wurden durch Rechromatographie an Dowex 50Wx4 weiter aufgearbeitet (Tabelle I und Abb. 4, 5, 6)

TABELLE I: Isolierung der α-tryptischen Peptide des Goldfisches

(Die Analysen sind in Tabelle II, die Aminosäurereihenfolge in Sequenzierschema Abb. 10 wiedergegeben)

Tryptischer Gipfel	Peptid-gemisch	Trennmethoden	Sequenzierung
B 1	Tp 9b		Tp 9b Quadrolprogramm
B 3	Tp 1 (a+b) Tp 4b Tp 9a	Tp 1 (a+b) - Gipfel B3-IV Tp 4b - Gipfel B3-III Tp 9a - Gipfel B3-II Dowex 50Wx4 (Abb 4)	Tp 4b Propinprogramm Tp 9a Quadrolprogramm
B 4	Tp 5 verunreinigt	zwei Mal Dowex 50Wx4 (Abb. 5) Tp 5 - Gipfel 1+2	 Tp 5 Quadrolprogramm
B 5	 Tp 2 Tp 4a Tp 6 Tp 8	Dowex 50Wx4 (Abb. 6) Tp 2 - Gipfel B5-V Tp 4a - Gipfel B5-VIII Tp 6 - Gipfel B5-XI+XII Tp 8 - Gipfel B5-X	 Tp 2 und Tp 6 Quadrolprogramm Tp 4a und Tp 8 Propinprogramm
B 6 + 7	 Tp 3 Tp 10	Dowex 50Wx4 Tp 3 - Gipfel B(6+7)-IV Tp 10 - Gipfel B(6+7)-III	 Tp 3 Propinprogramm Tp 10 ist lt.Analyse nur aus zwei Resten LEU-ARG aufgebaut

Fortsetzung Tabelle I

B 8	Tp 14		Tp 14 besteht nur aus Tyr-Arg
"α-Core"	Tp 11 Tp 12+13	Das mit Perameisensäure oxydierte Core wurde mit Trypsin nachgespalten und anschließend an DOWEX 50Wx4 rechromatographiert (Abb. 7) Tp 11	Tp 11 Propinprogramm

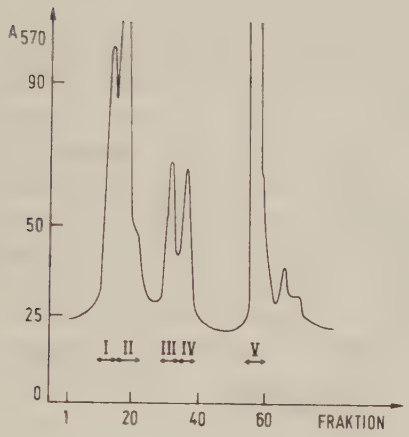


Abb. 4
Rechromatographie des α-B3 (Goldfisch) auf DOWEX 50Wx4 (Bedingungen Tabelle XV, Kapitel V)

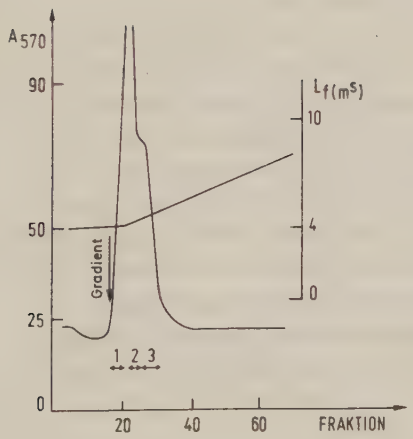


Abb. 5
Rechromatographie von α-B4-III vom Goldfisch (Bedingungen Tabelle XV, Kapitel V)

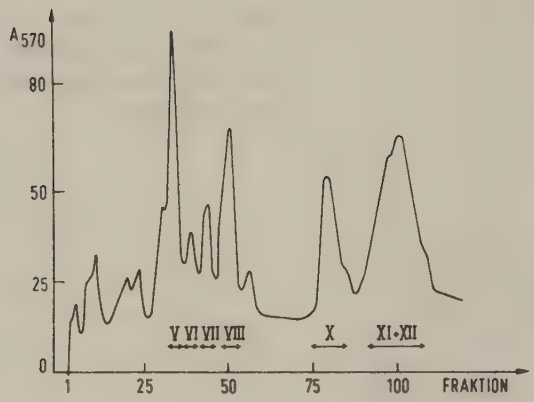


Abb 6 Rechromatographie von αB5 vom Goldfisch auf DOWEX 50Wx4 (Bedingungen Tabelle XV, Kapitel V)

Das Peptid Tp1 (a+b) (α 1-7) enthielt die blockierte N-terminale Aminosäure. Um das Peptid der Sequenzanalyse zugänglich zu machen, wurde dies mit Chymotrypsin gespalten.
1.8 μMol Peptid wurden mit 3 mg Chymotrypsin bei pH 8.6 und 37°C 48 Stunden inkubiert und über Dowex 50Wx4 rechromatographiert (Abb 8). Es entstanden zwei Peptide. Ein Dipeptid (α1-2), das die blockierte N-Terminale Aminosäure enthält und ein Pentapeptid (α 3-7). Bei diesem pH wurde nur das Pentapeptid am Harz absorbiert, während das Dipeptid mit der Front durchlief (Gipfel I in der Abb. 8). Das absorbierte Pentapeptid konnte mit 2 M Pyridin-Acetat pH 6 eluiert werden (Gipfel III). Die Sequenzbestimmung dieses Peptides wurde mit dem Propinprogramm durchgeführt und im Sequenzierschema Abb. 10 wiedergegeben. Das Dipeptid (α 1-2) konnte mit der Methode der Massenspektroskopie analysiert werden.

Die wässrige Lösung des Dipeptids (1 µMol) wurde einrotiert. Nach Lösen des Rückstandes in 200 ul Methanol wurden 50 ul mit ätherischer Diazomethanlösung umgesetzt und 2 min. einrotiert. Der Rückstand wurde in 20 µl Methanol aufgenommen und zur Aufnahme des Massenspektrums (Festprobeneinlaß) in einen Goldtiegel gebracht. Das Massenspektrum bestätigte durch die Fragmentierung, daß Ac-Ser-Leu-OCH_3 vorlag. Für eine zusätzliche Kontrolle wurde das synthetische Ac-Ser-Leu-OCH_3 hergestellt und dessen Massenspektrum mit dem des Dipeptides verglichen: Sie waren identisch. So konnte eindeutig festgestellt werden, daß die Reihenfolge der Aminosäuren im Dipeptid Acetyl-Ser-Leu und die blockierende Gruppe der N-terminalen Aminosäure Acetyl ist.

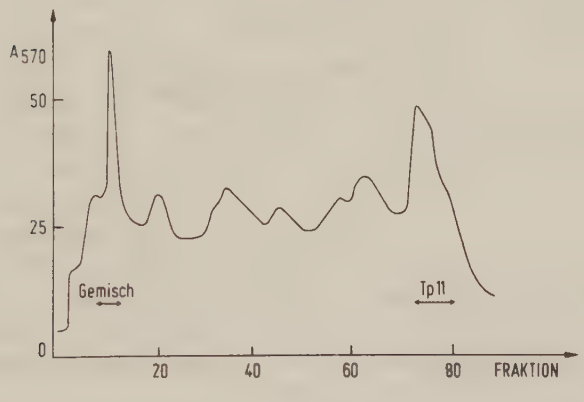


Abb 7 Rechromatographie des Goldfisch-α-Cores auf DOWEX 50Wx4
Bedingungen Tabelle XV, Kapitel V

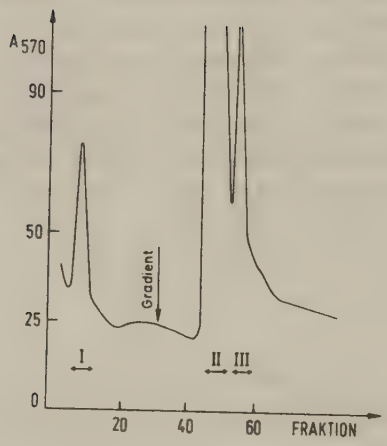


Abb 8 Rechromatographie des chymotryptischen Gemisches Tp 1a+b (α1-7) vom Goldfisch
Bedingungen Tabelle XV, Kapitel V

II.D.2. Spaltung der Asp-Pro-Bindung der α-Ketten

Da nach der Sequenzanalyse des Peptides Tp 11 (α 94-100) in Position 95-96 eine Asp-Pro-Bindung gefunden wurde, schien die Methode der selektiven Spaltung dieser Bindung für die weitere Analyse des C-Terminalen Bereiches der α-Ketten vorteilhaft.
Es wurden 60 mg α-Ketten gespalten. Das Pro-Peptid α 96-142 wurde rein isoliert und mit dem Propin-Programm sequenziert.
Die Analyse ist in Tabelle II, die Sequenz in Abb. 10 wiedergegeben.

II.D.3. Spaltung am Tryptophan der α-Ketten

Da nach der tryptischen Spaltung ein freier Lys-Rest gefunden wurde, der auf Grund der Homologie mit der α-Kette vom Karpfen, in den Positionen 58 oder 61 zugeordnet werden kann, wurde eine Spaltung am Tryptophan der α-Ketten gemacht, um das Überlappungspeptid (47-142) zu gewinnen.
50 mg (3 uMol) α-Ketten wurden mit 100 mg Jodosobensoesäure in 4 M Guanidin/HCL in 80%iger Essigsäure umgesetzt und 24 Stunden im Dunklen reagieren gelassen. Danach wurde die Probe entsalzt und auf einer Säule Sephadex G-50 fine in 8M Harnstoff in 10%iger Ameisensäure analysiert (Abb. 9).
Der Gipfel II enthielt das gesuchte Peptid, dessen Reinheit durch die N-terminale Aminosäure bestätigt wurde. Die Bestimmung der Aminsäuren (18 Schritte) erfolgte mit dem Propin-Programm.
Im Sequenzierschema (Abb. 10) ist diese Sequenz wiedergegeben.

II.D.4. Die Sequenz der α-Ketten des Goldfisches

Die Sequenzierung der α-Ketten erfolgte im wesentlichen an den tryptischen Peptiden, die aufgrund der Homologie (4) zu den α-Ketten des Karpfens (5) zugeordnet werden konnten. Zur Bestimmung des blockierten N-Terminus mußte Tp1(a+b) chymotryptisch nachgespalten werden.
Die Zuordnung des freien Lys in Position 58 war durch Spaltung am Tryptophan und Sequenzierung des Peptids (Pos. 47-142) möglich.

Der C-terminale Bereich konnte durch die Asp-Pro-Spaltung isoliert und in einem Sequenzerlauf direkt sequenziert werden. In Position 47 und 54 wurden zwei Aminosäurereste Ala + Ser bzw. Gly + Ala gefunden.
Die Tabelle II gibt die Analysen der isolierten Peptide wieder. Trotz einiger abweichender Werte stimmen die Analysen in der Gesamtheit mit den Werten der Ketten überein. Das Sequenzierschema Abb. 10 gibt die vollständige Sequenz der α -Ketten mit den Teilsequenzen der isolierten Peptide wieder.

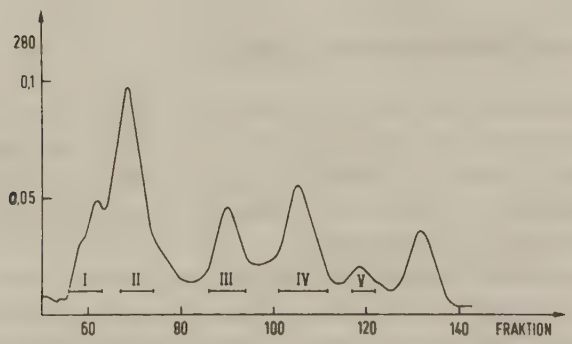


Abb. 9 Trennung des Gemisches nach der Spaltung am Tryptophan der α-Ketten des Goldfisches
Säule: Sephadex G50 fine (2,5 x 110 cm)
Puffer: 10% Ameisensäure
Durchflußrate: 12 ml/Stunde, Fraktion 4 ml/20 Min.

Tabelle II - Aminosäureanalyse der α -tryptischen Peptide, des Pro-Peptids und der α-Kette vom Goldfisch

Amino-säure	Tryptische Peptide													Pro-Peptid	α -Kette
	Tp1(a+b)	Tp2	Tp3	Tp4a	Tp4b	Tp5	Tp6	Tp7	Tp8	Tp9a	Tp9b	Tp10	Tp11		
Asp	1,71				1,09		1,05			1,36	2,05		2,03	5,80	13,34
Thr						2,07	0,95			0,96				1,44	5,26
Ser	1,80			1,33			3,75			1,29	2,49			2,93	12,62
Glu					1,99	1,33					1,02			3,04	7,43
Pro						0,86	1,73						0,94	2,43	6,41
Gly				1,11	1,85		2,08		0,98	2,20	1,02			2,74	10,37
Ala		1,10	2,12		3,04		0,67			2,16	3,19		1,06	4,68	14,51
Cys															
Val		1,81				0,97	0,99			2,24	1,45			3,65	12,27
Met						0,74				0,83				N.B.	3,78
Ile				0,79	0,96					1,03	1,29		0,97	2,00	7,71
Leu	0,99		1,07		1,24	1,22	1,02				3,52	1,03		4,79	14,86
Tyr						0,82	0,99							0,95	2,94
Phe							1,05				1,01		0,90	3,81	7,11
Trp			N.B.				N.B.								2
Lys	2,44	1,68	0,82			1,02	0,87	1	1,03	1,25	1,02		1,09	3,67	12,63
His							0,91		0,99		0,65			1,81	4,87
Arg				0,72	0,96							0,98		1,36	4,14
Summe	7	4,7*	4+1	4	11	9	17+1	1	3	12	17,5	2	7	46+2	141,5

* Das Peptid Tp2 enthält freies Lys von Peptid Tp7

N.B. = nicht bestimmt

Abb. 10 - Sequenzierschema der α-Ketten des Goldfisches

10 20

Ac-Ser-Leu-Ser-Asp-Lys-Asp-Lys-Ala-Val-Val-Lys-Ala-Leu-Trp-Ala-Lys-Ile-Gly-Ser-Arg-Ala-Asp-Glu-Ile-Gly-Ala-Glu-Ala-

Tp1 (a+b) Tp2 Tp3 Tp4a Tp4b

30 40 50

Leu-Gly-Arg-Met-Leu-Thr-Val-Tyr-Pro-Gln-Thr-Lys-Thr-Tyr-Phe-Ser-His-Trp-Ala/Ser-Asp-Leu-Ser-Pro-Gly-Ser-Gly/Ala-Pro-Val-Lys-

Tp5 Tp6

Tryptophan Peptid

60 70 80

Lys-His-Gly-Lys-Thr-Ile-Met-Gly-Ala-Val-Gly-Asp-Ala-Val-Ser-Lys-Ile-Asp-Asp-Leu-Val-Gly-Ala-Leu-Ser-Ala-Leu-Ser-Glu-

Tp7 Tp8 Tp9a Tp9b

Tryptophan-Peptid

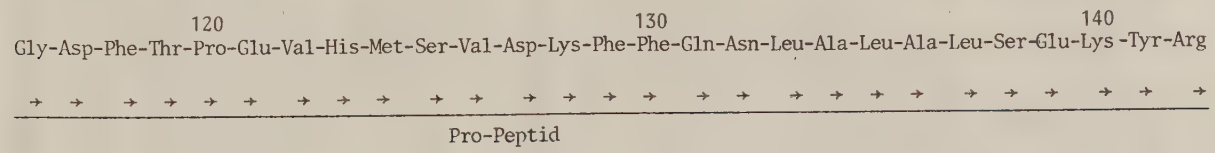
90 100 110

Leu-His-Ala-Phe-Lys-Leu-Arg-Ile-Asp-Pro-Ala-Asn-Phe-Lys-Ile-Leu-Ala-His-Asn-Val-Ile-Val-Val-Ile-Gly-Met-Leu-Phe-Pro-

Tp10 Tp11

Pro-Peptid

Fortsetzung von Abb. 10



II.E. Sequenzanalyse der ß-Ketten des Goldfisches

II.E.1. Analyse der Kette

Die ß-Ketten wurden 50 Schritte N-Terminal im Sequenator im Quadrolprogramm abgebaut. Es wurde folgende Sequenz erhalten:

Val-Glu-Trp-Thr-Asp-Ala-Glu-Arg-Ser-$\overset{10}{\text{Ala}}$-Ile-Ile-Gly-Leu-Trp-Gly-Lys-Leu-Asn-$\overset{20}{\text{Pro}}$-Asp-Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Ala-Leu-Ala-$\overset{30}{\text{Arg}}$-Cys-Leu-Ile-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-$\overset{40}{\text{Arg}}$-Tyr-Phe-Ala-Thr-Phe-Gly-Asn-Leu-Ser-$\overset{50}{\text{Ser}}$

Die Aminosäureanalyse der Ketten ist in Tabelle IV wiedergegeben. Für weitere Versuche wurden die SH-Gruppen carboxymethyliert.

II.E.2. Spaltung der Asp-Pro-Bindung und Isolierung der Peptide

Da beim Karpfen sowohl in der $ß_A$-Kette als auch in der $ß_B$-Kette (3) in Pos. 99 - 100 eine Asp-Pro-Bindung vorliegt, haben wir aufgrund der Homologie (4) angenommen, daß in der ß-Kette des Goldfisches dieselbe Peptidbindung vorhanden sein könnte. Deshalb schien die Methode zur selektiven Spaltung dieser Bindung für die weiteren Untersuchungen vorteilhaft. Es wurden 300 mg (18 µMol) ß-Ketten in 8 ml 6M Guanidin in 70%iger Ameisensäure 72 Stunden bei 42°C inkubiert. Das Peptidgemisch wurde auf einer Sephadex G-50 fine Säule mit 8M Harnstoff in 10%iger Ameisensäure getrennt (Abb. 11).

Gipfel A - 18%	Ungespaltenes Material, das wieder verwendet wurde
Gipfel B - 33%	N-Terminales Peptid (ß 1-99)
Gipfel C - 11%	Pro-Peptid, C-Terminal (ß 100-147)
Gipfel D - 3,2%	nicht zu identifizierendes Material

Die Identität sowie auch die Reinheit der Gipfel wurde durch Endgruppe und Analyse bestimmt.

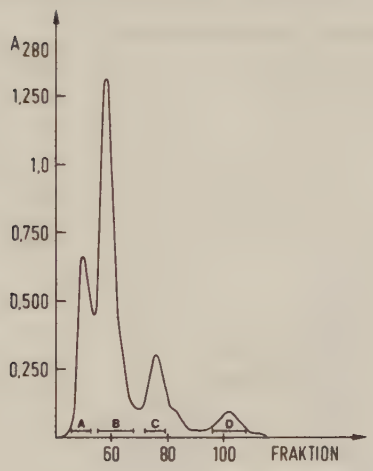


Abb. 11 Trennung des ß-Peptidgemisches vom Goldfisch nach Asp-Pro Spaltung der Kette
Säule: Sephadex G-50 fine (2,5x180 cm)
Puffer: 8M Harnstoff in 10%iger Ameisensäure
Durchflußrate: 18 ml/h, Fraktion 6ml/20 Min.

Die Sequenzierung des Pro-Peptids (ß 100-147) wurde mit dem Propin-Programm durchgeführt. Die Aminosäurefolge ist im Sequenzierschema (Abb. 15), die Analyse in Tabelle IV wiedergegeben.

II.E.3. Tryptische Nachspaltung des N-terminalen Peptids aus der Asp-Pro-Spaltung der ß-Ketten und Isolierung der Peptide

Die von der Asp-Pro-Spaltung gewonnene Fraktion B (75 mg-6 µMol Peptid) wurden mit 2% TPCK-Trypsin bei pH 11 und Raumtemperatur vier Stunden nachgespalten.
Die Vortrennung der Peptide erfolgte auf Sephadex G-25 in 0,01M NH_4HCO_3 pH 9.5 (Abb. 12).

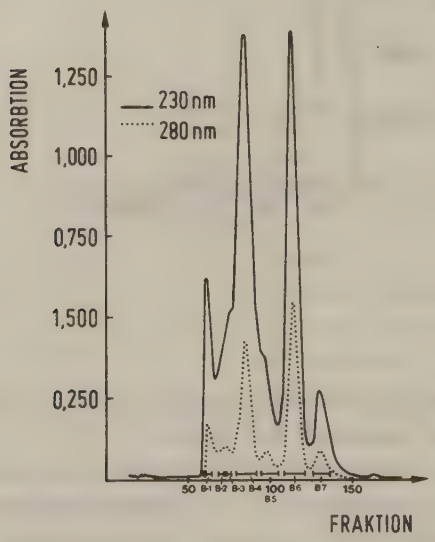


Abb. 12 Vortrennung der ß-tryptischen Peptide vom Goldfisch auf Sephadex G-25
Säule: Sephadex G-25 fine (2,5x145 cm)
Puffer: 0,01M NH_4HCO_3 pH 9,5
Durchflußrate: 15 ml/h, Fraktion 4,6 ml/20Min.

Die Gipfel wurden durch analytische Hochspannungselektrophorese am Papier auf Einheitlichkeit geprüft.
Die einzelnen Peptide konnten entweder durch Rechromatographie an DOWEX 50Wx4 in Pyridin-Acetat oder durch präparative Hochspannungselektrophorese auf Papier rein isoliert werden. (Tab. III).

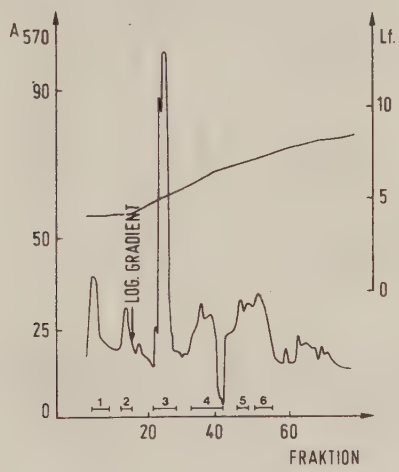


Abb. 13 Rechromatographie des ß-B 4-III Gemisches (Goldfisch) auf DOWEX 50Wx4 (Bedingungen Tabelle XVI, Kapitel V)

Tabelle III - Isolierung der ß-tryptischen Peptide des Goldfisches

(Die Analysen sind in Tab.IV, die Aminosäurereihenfolge im Sequenzierschema Abb.15 wiedergegeben)

Tryptischer Gipfel	Peptidgemisch	Trennmethoden	Sequenzierung
B 4	Tp1 Tp5 Tp8+9a Tp9c Tp10	Präparative Hochspannungs-elektrophorese am Papier: Tp1, Tp5, Tp10 Nachreinigung an Dowex50Wx4 (Abb.13): Tp8+9a,Tp9c (Gipfel 5)	Tp5, Tp9c und Tp10 - Reagenz IV, Quadrol-Programm Tp8+9a - Propin-Programm
B 5	chymotryp-tisches Peptid Pos.83-88) Tp9b Tp9c Tp11a	Dowex 50W x 4 (Abb. 14) Pos. 83-88 (B 5-I) Tp9b (Gipfel B5 - VIII) Tp9c (Gipfel B5 - IV+V) Tp11a (Gipfel B5 - VII)	Tp9b und Tp11a - Propin-Programm
B 6	Tp2 Tp(6+7) Tp9b	Präparative Hochspannungs-elektrophorese und Rechromato-graphie auf Dowex 50Wx4 zur Isolierung des Peptids Tp(6+7)	Tp(6+7)-Propin-Programm

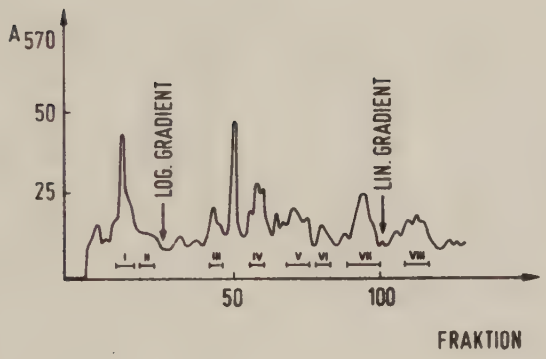


Abb. 14 Rechromatographie der ß-B 5 Fraktion (Goldfisch) auf DOWEX 50Wx4 (Bedingungen Tabelle XVI, Kapitel V)

II.E.4. Die vollständige Sequenz der ß-Ketten des Goldfisches

Die Sequenz der ß-Ketten wurde durch N-terminalen Abbau der Ketten über 50 Schritte, durch saure Spaltung der Asp-Pro-Bindung für den C-terminalen Bereich und durch die tryptischen Peptide des mittleren Bereiches aufgeklärt. Die Zuordnung erfolgt 3teilig aufgrund der Homologie (4) zu den ß-Ketten des Karpfen (3). Ein wesentlicher Fortschritt für die Sequenzanalyse konnte durch die saure Spaltung der Asp-Pro-Bindung erreicht werden. Diese erlaubte, die Primärstruktur des C-terminalen Bereiches bzw. des "Cores" in einem einzigen Sequenzerlauf zu bestimmen.

Die Tabelle IV gibt die Aminosäureanalysen der isolierten Peptide, die Abb. 15 das Sequenzierschema der Kette wieder.

Tabelle IV - Aminosäureanalyse der ß-tryptischen Peptide, des Pro-Peptids und der ß-Kette vom Goldfisch

Amino-	Tryptische Peptide											Pro-Peptid	
Säure	Tp1	Tp2	Tp3	Tp4	Tp5	Tp6+7	Tp8+9a	Tp9b	Tp9c	Tp10	Tp11a	Tp11b - 15	ß-Kette
Asp	1,02		2,07		2,47				3,04		1,13	4,52	15,00
Thr	1,12			1,16	1,18		1,05			1,03		1,18	5,95
Ser		1,29			2,04					2,11		2,93	8,62
Glu	1,90		2,00	1,15			1,15			1,03		3,77	11,00
Pro			2,00	1,34	2,08					1,53		2,49	7,57
Gly		2,43	1,09		2,42	1,00	1,73					2,35	10,12
Ala	0,99	1,38	1,90		2,73	2,01		1,33		2,25		5,62	17,74
Cys				N.B.								N.B.	4,20
Val	0,88			0,55*		0,99	1,31			0,99	0,99	3,95*	11,14
Met					N.B.		N.B.		N.B.	N.B.		N.B.	4,95
Ile		0,5*		0,61*	0,83			0,74	0,78			1,34	6,00
Leu		1,22	2,94	1,12	1,40		1,02			1,12	0,90	3,97	13,20
Tyr				1,02	0,45					0,45		1,03	3,92
Phe					1,53							3,54	5,99
Trp	N.B.	N.B.		N.B.								0,76	2,81
Lys		1,18			1,09			0,91	1,17	1,23		2,07	7,17
His						0,99				0,93	0,99	1,03	3,83
Arg	1,05		0,98	1,10		1,05	0,77					1,96	7,07
Summe	7+1	7+1	13	8+2	17,5+1	6	7+1	3	5+1	12,5	4	43+4	147

* Die Werte beziehen sich auf die 20 Stunden-Hydrolyse

N.B. = nicht bestimmt

Abb. 13 - Sequenzierschema der β-Ketten des Goldfisches

10 20

Val-Glu-Trp-Thr-Asp-Ala-Glu-Arg-Ser-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Trp-Gly-Lys-Leu-Asn-Pro-Asp-Glu-Leu-Gly-Pro-Gln-Ala-Leu-

Kettenlauf

Tp1 Tp2 Tp3

30 40 50

Ala-Arg-Cys-Leu-Ile-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Tyr-Phe-Ala-Thr-Phe-Gly-Asn-Leu-Ser-Ser-Pro-Ala-Ala-Ile-Met-Gly-

Kettenlauf

Tp4 Tp5

60 70 80

Asn-Pro-Lys-Val-Ala-Ala-His-Gly-Arg-Thr-Val-Met-Gly-Gly-Leu-Glu-Arg-Ala-Ile-Lys-Asn-Met-Asp-Asn-Ile-Lys-Ala-Thr-

Tp(6+7) Tp(8+9a) Tp9b Tp9c Tp10

90 100 110

Tyr-Ala-Pro-Leu-Ser-Val-Met-His-Ser-Glu-Lys-Leu-His-Val-Asp-Pro-Asp-Asn-Phe-Arg-Leu-Leu-Ala-Asp-Cys-Ile-Thr-Val-

Tp11a Pro-Peptid

120 130 140

Cys-Ala-Ala-Met-Lys-Phe-Gly-Pro-Ser-Gly-Phe-Asn-Ala-Asp-Val-Gln-Glu-Ala-Trp-Gln-Lys-Phe-Leu-Ser-Val-Val-Val-Ser-

Pro-Peptid

Ala-Leu-Cys-Arg-Gln-Tyr-His

Pro-Peptid

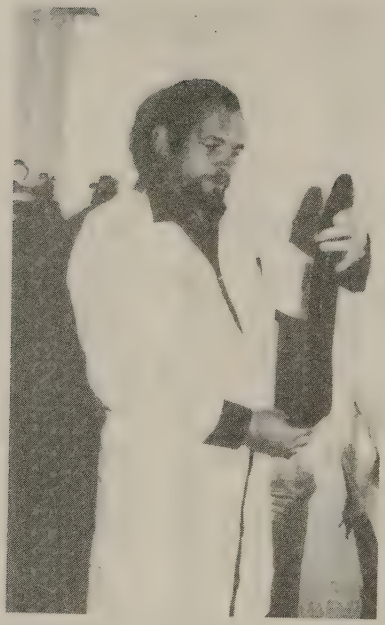


Abb. 16, 17 Südamerikanischer Lungenfisch
(Lepidosira Paradoxus)

III. DAS HÄMOGLOBIN DES LUNGENFISCHES

III.A. Gewinnung des Hämoglobins und des Globins Bestimmung der Anzahl der Komponenten und der Ketten

Die Gewinnung dieses Hämoglobins erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie beim Goldfisch. Ausbeute: Von 10 Lungenfischen zwischen 50 - 60 cm Länge konnten 200 ml Blut bzw. 8,7 g Hämoglobin erhalten werden.
Zur Bestimmung der Hämoglobin-Komponenten wurde eine Polyacrylamid Diskelektrophorese bei pH 8,3 durchgeführt (Abb. 18 + 19).

Abb. 18 Polyacrylamid Diskelektrophorese des Lungenfischhämoglobins bei pH 8,3

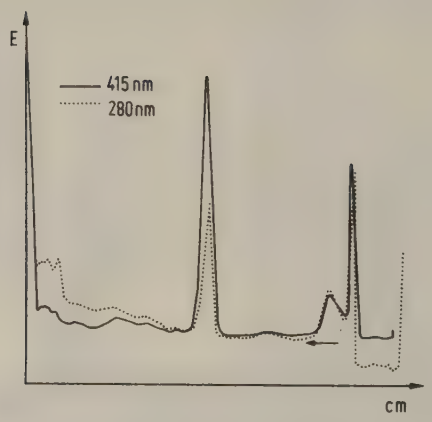


Abb. 19 Scanning des Gels von der Polyacrylamid Diskelektrophorese des Lungenfischhämoglobins bei pH 8,3 bei 280nm und 415nm

Der Lungenfisch weist nur eine Hämoglobinkomponente auf. Nach der Abspaltung des Häms in salzsaurem Aceton bei -20°C wurde das Globin in der Polyacrylamid-Röhrchen-Elektrophorese im Harnstoff bei pH 3,5 auf die Zahl der Ketten geprüft. Wie in Abb. 20 ersichtlich, wurde das Globin in drei Ketten getrennt.

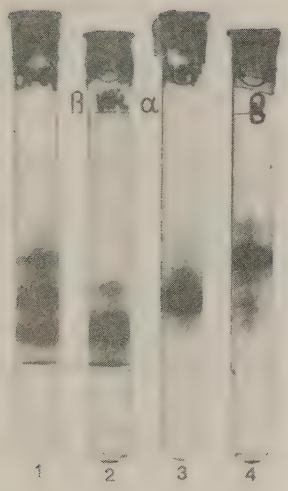


Abb. 20 Polyacrylamid-Elektrophorese im Harnstoff bei pH 3,5 des Lungenfischglobins

Probe 1 - gesamtes Globin

Probe 2 - β_A-Kette
Probe 3 - α -Kette
Probe 4 - B - Kette
} nach der Kettentrennung

Da durch die Bestimmung der N-terminalen Aminosäure des Globins nur zwei Aminosäuren: Valin und Methionin festgestellt werden konnten, folgern wir, daß die dritte Kette einen blockierten N-Terminus hat.

III.B. Kettentrennung des Globins

Als die beste Methode für die Trennung der Ketten erwies sich die Chromatographie des carboxymethylierten Globins auf DEAE-Sephacel bei pH 8,5 (Abb. 21). Nach dreistündigem Rühren des CM-Globins in 0,025M Tris/HCL Puffer mit 8M Harnstoff und 4% ß-Mercaptoäthanol pH 8,5 unter Stickstoff wurde die Probe auf die Säule aufgetragen.

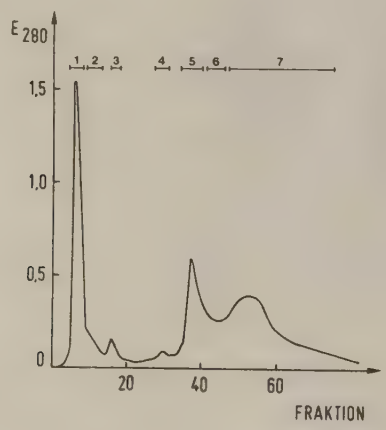


Abb. 21 Chromatographie des carboxymethylierten Globins vom Lungenfisch.
Säule: DEAE Sephacel (2,5x10cm)
Äquilibrier Puffer: 0,025M Tris/HCL mit 8M Harnstoff und 1% ß-Mercaptoäthanol pH 8,5
Gradient: 400ml Äquilibrierpuffer und 400ml Äquilibrierpuffer mit 0,2M NaCl
Durchflußrate: 27 ml/h
Fraktionsvolumen: 9 ml/20 Min
Aufgetragene Menge: 300mg CM-Globin

In Gipfel 1 konnten die Ketten, die mit Valin beginnen ($ß_A$-Ketten), in Gipfel 5 die blockierten Ketten (B-Ketten) und in Gipfel 7 die Ketten, die Methionin als N-terminale Aminosäure enthalten (α-Ketten), isoliert werden (Abb. 21). Die Ausbeute betrug: zwischen 20-30% $ß_A$-Ketten, 10-16% B-Ketten und 40-45% α-Ketten.
Das quantitative Verhältnis ist: B-Kette:$ß_A$-Kette:α-Kette 1:2:3
Wie sich aus der Primärstruktur ergab, ist die Met-Kette eine α- und die Val-Kette eine ß-Kette. Aus dem quantitativen Verhältnis zwischen den Ketten schließen wir, daß die dritte, blockierte Kette vom ß-Typ sein müßte. Die Analysen sind in Tabelle V wiedergegeben.

III.C. Sequenzanalyse der α-Ketten des Lungenfisches

III.C.1. Analyse der Kette

Die α-Kette wurde 40 Schritte im Sequenator mit dem Quadrol-Programm abgebaut. Es gab die folgende Sequenz:

Met-Arg-Phe-Ser-Gln-Asp-Asp-Glu-Val-$\overset{10}{\text{Leu}}$-Ile-Lys-Glu-Ala-Trp-
Gly-Leu-Leu-His-$\overset{20}{\text{Gln}}$-Ile-Pro-Asn-Ala-Gly-Gly-Glu-Ala-Leu-$\overset{30}{\text{Ala}}$-
Arg-Met-Phe-Ser-$\underset{\text{Cys}}{\overset{+}{\text{Asp}}}$-Tyr-Pro-Gly-Thr-$\overset{40}{\text{Lys}}$

III.C.2. Spaltung der Asp-Pro Bindung der α-Ketten

Das Pro-Peptid wurde nach 52stündiger Spaltung der α-Ketten (3 µMol) unter den in der Legende zu Abb. 22 angegebenen Bedingungen im Gipfel P4 isoliert. Es wurde mit dem Propin-Programm nur bis Pos. 124 durchsequenziert (Sequenzierschema Abb. 25, Tabelle VI).

Tabelle V - Aminosäureanalyse der Ketten des Lungenfisches

As	$ß_A$-Kette	α -Kette	B-Kette
Asp	14,58	11,60	16,91
Thr	3,99	5,11	5,87
Ser	10.94	8,64	15,97
Glu	12,56	14,99	11,16
Pro	3,98	5,14	8,49
Gly	9,21	10,11	9,75
Ala	11,39	12,06	11,11
Cys	0,96	2,50	0,89
Val	11,59	8,00	7,90
Met	1,39	3,39	1,99
Ile	8,38	8,19	6,20
Leu	13,39	12,97	12,80
Tyr	3,79	4,86	4,54
Phe	9,87	7,18	6,20
Try	2,24	1,28	2,61
Lys	10,26	9,08	9,85
His	11,88	10,01	7,85
Arg	8,35	4,31	3,68
Summe	147	142	145

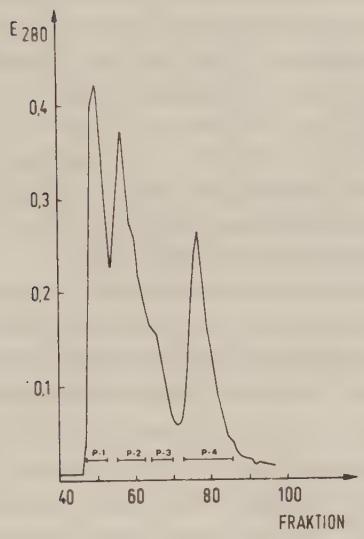


Abb. 22 Trennung des Peptidgemisches nach der Asp-Pro-Spaltung der α-Ketten des Lungenfisches
Säule: Sephadex G-50 fine (2,5x180cm)
Puffer: 8M Harnstoff in 10%iger Ameisensäure
Durchflußrate: 18ml/h
Fraktionsvolumen: 6ml/20Min

III.C.3. Spaltung an Methionin der α-Ketten

Die Zuordnung der Peptide Tp7a, Tp7b, Tp8 und Tp9a wie auch die Sequenz der Peptide Tp12b und Tp13+14 (Abb.25) wurde durch eine Spaltung mit BrCN erreicht (7). Durch diesen Versuch konnten die überlappenden Bereiche: Pos. 33-94 und Pos.109-143 (C-terminales Bruchstück) erhalten werden.
170mg Ketten wurden nach Reduktion (ß-Mercaptoäthanol in 6M Guanidin/HCl pH 8) mit BrCN (40facher Überschuß auf Methionin bezogen) in 70%iger Ameisensäure fünf Stunden umgesetzt. Das Gemisch wurde in 4ml 8M Harnstoff pH 3,5 aufgenommen und einer Gelchromatographie unterworfen (Abb.23).
Die in den Gipfeln enthaltenen Peptide konnten durch Endgruppen identifiziert werden. B3 enthielt das saubere Bruchstück Pos. 33-94. Dies wurde im Sequenator mit dem Propin-Programm 45 Schritte abgebaut (Sequenzierschema Abb.25,Tab.VI).

Das C-terminale Peptid (Pos 109-143) wurde in Gipfel B4 als Agregat mit dem Peptid (Pos 95-108) isoliert. Da die Sequenz des zweiten Peptides bekannt war, konnte sowohl bei der Sequenzierung des Gemisches als auch bei der Aminosäureanalyse durch einfache Subtraktion (Pos 95-108) die gewünschte Information erhalten werden (Abb.25, Tab.VI). Zwei Aminosäuren, die die Positionen 125 und 130 besetzen, konnten nicht eindeutig bestimmt werden.

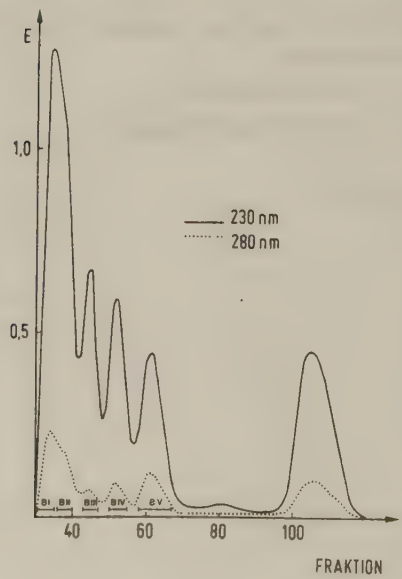


Abb. 23
Trennung der BrCN Peptide der α-Ketten des Lungenfisches
Säule: Sephadex G50 fine (2,5 x 110 cm)
Puffer: 8M Harnstoff pH3,5 (mit HCl)
Durchflußrate: 10 ml/h
Fraktionsvolumen: 5 ml/30 Min

III.C.4. Tryptische Spaltung

184 mg Ketten in verdünnter NaOH pH11 wurden mit TPCK-Trypsin bei Zimmertemperatur vier Stunden gespalten. Das Trypsin 4% (G/G) wurde in zwei Portionen zugesetzt und der pH-Wert während der ersten zwei Stunden durch Zusatz von NaOH auf pH 11 gehalten. Nach Beendigung der Spaltung wurde mit HCl eine Corefraktion bei pH 6 (53,4 mg) und eine bei pH 3,35 (5,35 mg) ausgefällt. Der im sauren lösliche Anteil wurde über Sephadex G-25 in 0,1M Essigsäure vorfraktioniert (Abb.24). Die Gipfel I und II enthielten Tp9a (Pos 64-88) und Tp8+9a (Pos 63-88) und wurden zusammen sowohl mit Propin-als auch mit Quadrol-Programm sequenziert, da eine weitere Trennung nicht notwendig war (Sequenzierschema Abb. 25). Die Analyse ist in Tab.VI wiedergegeben. Die Trennung der anderen Peptide erfolgte über DOWEX 50Wx4 in Pyridin-Acetat Puffern (Analyse Tab.VI).

Für die Sequenzanalyse war der Gipfel VII wesentlich. Durch dieses Verfahren wurden Tp5 (Pos 32-40) und Tp9b (Pos 89-91) isoliert und anschließend mit dem Quadrol-Programm (Tp5) bzw. Propin-Programm (Tp9b) sequenziert.
Die erste Corefraktion (pH6) enthielt mindestens vier Peptide, mit den Endgruppen Val, Phe, Glu und Thr. Im Gegensatz dazu enthielt die zweite Corefraktion (pH 3,35) nur ein Peptid Tp10+11+12a (Pos. 92-118). Es brachte die Überlappung von Pos. 92 über Pos. 96 und 97 (Asp-Pro-Bindung) zu Pos.118 und damit die Sequenz des fehlenden Bruchstückes 92-96.

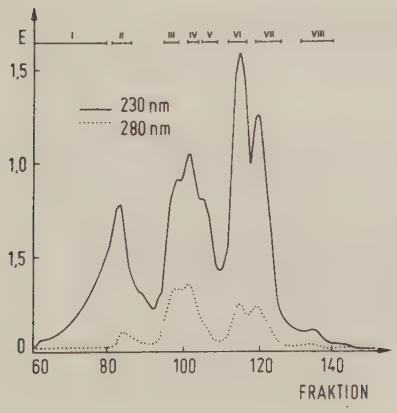


Abb. 24
Fraktionierung der tryptischen Peptide der α-Ketten
Säule:Sephadex G25 fine(2,5x130cm)
Puffer: 0,1M Essigsäure
Durchflußrate: 15 ml/h
Fraktionsvolumen: 5 ml/20Min

Tabelle VI - Aminosäureanalyse der tryptischen Peptide, des Pro-Peptids und der α-Kette des Lungenfisches

Aminosäure	Tp1a	Tp1b+2**	Tp3+4	Tp5	Tp6	Tp7a	Tp7b**	Tp8+9a	Tp9b	Tp10+11+12a	Pro-Peptid (Pos.97-143)	FR Nr.3 (Br-CN)	α -Kette
Asp		(2)	1,65	1,01	3,10			2,31		2,77**	4,37	5,56	11,60
Thr				1,02				1,10		1,62	2,28	1,96	5,11
Ser		(1)		0,93	1,94			2,96			1,90	5,64	8,64
Glu		(2)	2,67		0,94			2,71		3,72	5,18	5,53	14,99
Pro			1,04	0,97	1,03					1,07	1,89	2,12	5,14
Gly			2,40	0,92	0,99		(1)	1,94		1,24	2,47	5,02	10,11
Ala			3,15		0,94			1,22	1,03	2,82	4,38	3,75	12,06
Cys				(1)				0,69		N.B.	1,18	N.B.	2,50
Val		(1)				1,01		2,38*		1,38	2,00	3,35*	8,00
Met	0,77			0,93						N.B.	1,27		3,75
Ile		(1)	1,37					1,10		2,48	4,43*	1,21*	8,69
Leu		(1)	2,94					4,07		2,86	4,67*	5,50*	12,97
Tyr				0,96	0,95					1,50	2,40	1,91	4,86
Phe		(1)		1,03	3,07					1,15	2,43	4,03	7,18
Try			0,70										1,28
Lys		(1)		0,97	1,08	0,96	(1)	1,48		1,15	2,29	5,68	9,08
His			0,95		2,07		(2)	2,55	0,80	1,14	2,41	7,47	10,69
Arg	1,20		0,96						1,10		1,23	1,01	4,31
Summe	2	10	19	9+1	16	2	4	25	3	27	44+3	62	142

* Die Werte beziehen sich auf die 20 Stunden-Hydrolyse

** Da die Sequenz dieser beiden Peptide schon bekannt war, konnte auf ihre Isolierung verzichtet werden. Die Anzahl der Aminosäuren wurde aus der Sequenz entnommen.

N.B. = nicht bestimmt

III.C.5. Zur Sequenz der α-Ketten des Lungenfisches

Die Sequenz der α-Ketten (mit Ausnahme der Pos 125 und 130) wurde mit möglichst geringem Aufwand bestimmt. Es wurden drei Spaltmethoden benötigt. Die Isolierung der Peptide beschränkte sich auf das unbedingt nötige Maß. Eine Zuordnung durch überlappende Peptide könnte durch eine auf Methionin beschränkte Spaltung erreicht werden. In Pos 35 wurden zwei Aminosäuren CYS und ASP gefunden. Das Sequenzierschema Abb. 25 zeigt die Sequenz mit Teilsequenzen der isolierten Peptide.

III.D. Sequenzanalyse der β_A-Kette des Lungenfisches

III.D.1. Analyse der intakten Ketten

Nach dem Kettenlauf (42 Schritte) der β_A-Ketten im Sequenator im Quadrol-Programm wurde die folgende Sequenz erhalten:

Val - His - Trp - Glu - Asp - Ala - Glu - Lys - Gln - Tyr - (10)
Ile - Val - Ser - Val - Phe - Ser - Lys - Ile - Asp - Val - (20)
Asp - His - Val - Gly - Ala - Asn - Thr - Leu - Glu - Arg - (30)
Val - Leu - Ile - Val + Ala - Phe - Pro - Trp - Thr - Lys - Arg - (40)

Tyr - Phe

In Position 34 wurden zwei Aminosäuren gefunden: Ala + Val

III.D.2. Spaltung der Asp-Pro-Bindung und Isolierung der Peptide der β_A-Ketten

Es wurden 50mg (3 μMol) β_A-CM-Ketten gespalten. Von der eingesetzten Menge wurden 23 mg N-terminales Peptid (Pos 1-99) und ungespaltene Kette (46%) und 6mg Pro-Peptid (Pos 100 - 147) (12%) wiedergefunden. Jeder Gipfel wurde durch Endgruppenbestimmung auf seine Zusammensetzung geprüft. Nach der Analyse war das Pro-Peptid sauber (Tab. VIII) und wurde mit dem Propin-Programm durchsequenziert (Sequenzierschema Abb. 33).

Abb. 25 - Sequenzierschema der α-Kette des Lungenfisches

10 20

Met-Arg-Phe-Ser-Gln-Asp-Asp-Glu-Val-Leu-Ile-Lys-Glu-Ala-Trp-Gly-Leu-Leu-His-Gln-Ile-Pro-Asn-Ala-Gly-Gly-Glu-Ala-Leu-

Kettenlauf

Tp1a Tp1b+2 Tp3+4

30 40 50

Ala-Arg-Met-Phe-Ser-Asp/Cys-Tyr-Pro-Gly-Thr-Lys-Ser-Tyr-Phe-Pro-His-Phe-Gly-His-Asp-Phe-Ser-Ala-Asn-Asn-Glu-Lys-Val-Lys-

Kettenlauf

Tp5 Tp6 Tp7a

B3 (BrCN-Peptid)

60 70 80

His-His-Gly-Lys-Lys-Val-Val-Asp-Ala-Ile-Gly-Gln-Gly-Val-Gln-His-Leu-His-Asp-Leu-Ser-Ser-Cys-Leu-His-Thr-Leu-Ser-Glu-

Tp7b Tp8+9a

B3 (BrCN-Peptid)

90 100 110

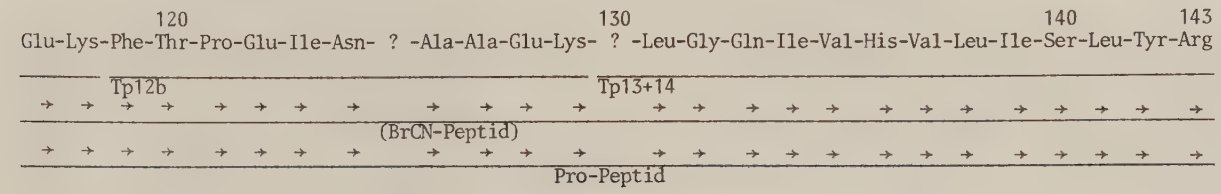
Lys-His-Ala-Arg-Glu-Leu-Met-Val-Asp-Pro-Cys-Asn-Phe-Gln-Tyr-Leu-Ile-Glu-Ala-Ile-Met-Thr-Thr-Ile-Ala-Ala-His-Tyr-Gly-

Tp9b Tp10+11+12a

(BrCN-Peptid)

Pro-Peptid

Fortsetzung von Abb. 25:



III.D.3. Tryptische Spaltung der β_A-Ketten und Isolierung der Peptide

13 µMol (200mg) Ketten wurden mit 2% TPCK-Trypsin bei pH 11 und Raumtemperatur vier Stunden gespalten. Das ungespaltene Material wurde abzentrifugiert und die klare Lösung mit 0,5N HCl bis auf pH 3,2 titriert. Es gab keine Core-Ausfällung, weder bei pH 6,5 noch bei pH 3,2.
Die Vortrennung der Peptide erfolgte auf einer Sephadex G-25 fine Säule im sauren Bereich (Abb. 26). Das Eluat wurde in 11 Gipfel aufgeteilt, die mit Papierelektrophorese (pH 5,4) auf ihre Zusammensetzung geprüft wurden.
Für die Sequenzanalyse der Ketten waren die Gipfel IV, V, VII, VIII wichtig (Tab. VII).

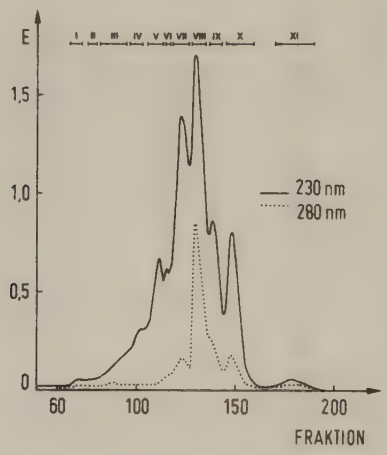


Abb. 26 Trennung der tryptischen Peptide der β_A-Ketten des Lungenfisches
Säule: Sephadex G-25 fine (2,5x130cm)
Puffer: 0,1M Essigsäure
Durchflußrate: 13,5ml/h, Fraktionsvolumen: 4,5ml/20Min

Tabelle VII - Isolierung der tryptischen Peptide der $ß_A$-Kette des Lungenfisches

Die Analysen sind in Tabelle VIII, die Sequenzen in Abb. 33 wiedergegeben

Tryptischer Gipfel	Peptidgemisch	Trennmethoden	Sequenzierung
	Tp 3	Dowex 50Wx4 (Abb. 27)	Tp 8+9a - Propin-Programm
III + IV	Tp 8+9a	Tp 3 Gipfel IV-1	
	Tp 10	Tp 8+9a Gipfel IV-2	
		Tp 10 Gipfel IV-3	
	Tp 3	Dowex 50Wx4 (Abb.28)	Tp 10 - Propin-Programm
V	Tp 10	Tp 3 Gipfel V-2	
	Tp 9a+Tp12b	Tp 10 Gipfel V-3	
		Tp 9a+12b - Gipfel V-1	
	Tp 12b		nicht erforderlich
VI	verunreinigt		
		Dowex 50Wx4 (Abb.29)	
VII	Tp 5a	Tp 5a Gipfel VII-1	Tp 5b, Tp 6+7 und Tp 11 - Propin-Programm
	Tp 5b + Tp6+7	Tp 5b + Tp6+7 - Gipfel VII-6	
	Tp 11	Tp 11 Gipfel VII-7	
	Tp 12a	Tp 12a Gipfel VII-3	
	Tp 14	Tp 14 Gipfel VII-4+5	

Fortsetzung von Tabelle VII:

		Gemisch VII-6: präparative Chromatographie am Papier mit folgendem System: n-Butanol: Pyridin:Wasser = 35:35:30; Trennung von Tp5b und Tp6+7	
		Dowex 50Wx4 (Abb.30)	
VIII	Tp 1	Tp 1 - Gipfel VIII-11	Tp 9b - Propin-Programm
	Tp 2	Tp 2 - Gipfel VIII-1	
	Tp 5a	Tp 5a - Gipfel VIII-2+3	
	Tp 5b+Tp6+7	Tp 5b+Tp6+7 - Gipfel VIII-12	
	Tp 9b	Tp 9b - Gipfel VIII-9	
	Tp 12a	Tp 12a - Gipfel VIII-5	
	Tp 13a	Tp 13a - Gipfel VIII-6	
	Freies Lys	Freies Lys - Gipfel VIII-7	
	Tp 4a	Präparative Chromatographie	Tp 4a - Quadrol-Programm
IX	Freies Arg	am Papier mit folgendem	
	Tp 4b	System: n-Butanol:Pyridin:	
	Tp 13b	Wasser = 35:35:30 Tp 4a	
	Tp 15		nicht erforderlich
X	verunreinigt		

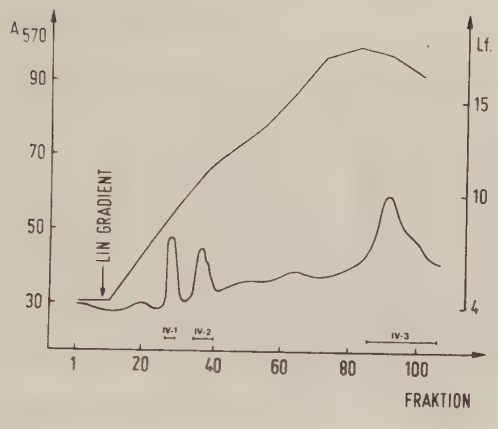


Abb. 27 Rechromatographie des β_A-IV tryptischen Gemisches vom Lungenfisch auf DOWEX 50Wx4
(Bedingungen Tab.XVII,Kap. 5)

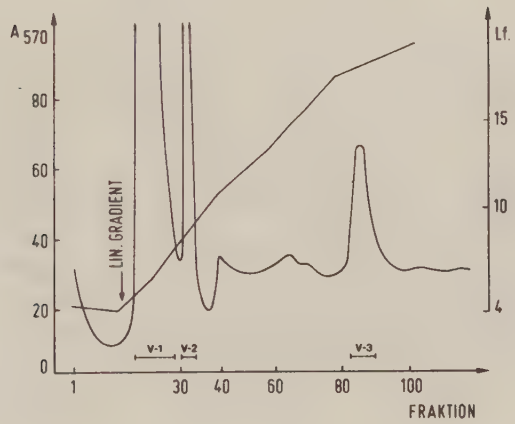


Abb. 28 Rechromatographie des β_A-V tryptischen Gemisches vom Lungenfisch auf DOWEX 50Wx4
(Bedingungen Tab. XVII, Kap. V)

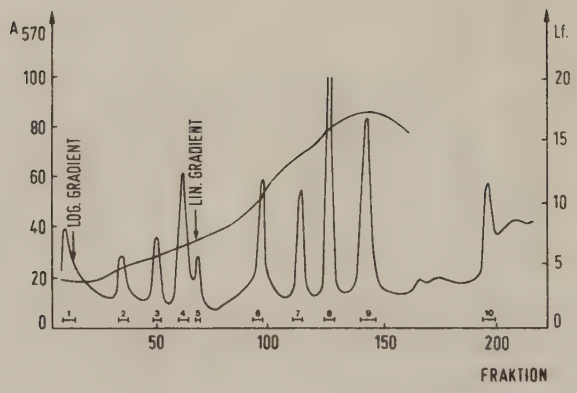


Abb. 29 Rechromatographie des β_A-VII tryptischen Gemisches vom Lungenfisch auf DOWEX 50Wx4 (Bedingungen Tab. XVII, Kap. V)

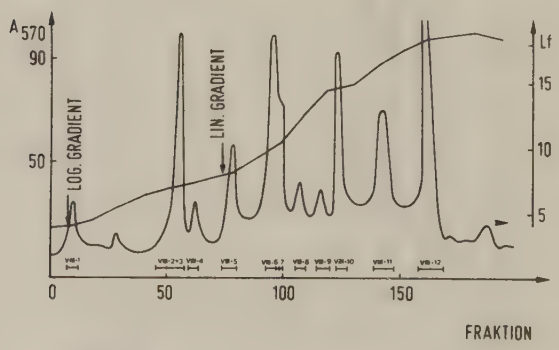


Abb. 30 Rechromatographie des β_A-VIII tryptischen Gemisches vom Lungenfisch auf DOWEX 50Wx4 (Bedingungen Tab. XVII, Kap. V)

III.D.4. Spaltung am Tryptophan

Um das Überlappungspeptid Pos. 38-70, wo die Zuordnung der tryptischen Peptide nach der Homologie mit der β_A-Kette vom Karpfen (3) nicht möglich war, zu erhalten, wurde eine Spaltung am Tryptophan mit o-Jodosobensoesäure (6) durchgeführt.
50mg Ketten wurden in 4ml Guanidin/HCL in 80%iger Essigsäure gelöst und mit 100mg o-Jodosobensoesäure 24 Stunden im Dunklen umgesetzt. Nach dem Entsalzen erfolgte die Trennung der Peptide auf einer Sephadex G-50 fine Säule (2,5x100cm) mit 9%iger Ameisensäure (Abb.31). Das Eluat wurde bei 280 und 245 nm vermessen.
Nach den Endgruppenbestimmungen haben die Gipfel folgende Zusammensetzung:

Gipfel Nr. 1	3 Peptide, die mit Glu, Val und Ile beginnen
Gipfel Nr. 2	5 Bruchstücke mit Glu, Val, Ile, Phe und Thr als N-Terminus
Gipfel Nr. 3	2 Peptide mit Phe und Thr als N-terminale Aminosäure

Daß der Gipfel Nr. 3 neben dem Peptid Pos 38-147 (welches mit Thr beginnt) auch das Peptid Pos 42-147 (Phe als N-Terminus) enthält, beweist das Vorhandensein einer zusätzlichen Spaltung zwischen Tyr (Pos 41) und Phe (Pos 42). Da für die weitere Bestimmung der Sequenz das Thr-Peptid (Pos 38-147) wesentlich war, wurde der Gipfel Nr. 3 über CM-Sepharose CL6B rechromatographiert (Abb. 32).
Der Hauptgipfel wurde in drei Teile geschnitten:
Fr. Nr. 3a, 3b und 4. Die Fr. Nr. 3b und 4 enthielten nach der Endgruppenbestimmung das gewünschte reine Peptid Pos 38-147.
Es wurde im Sequenator mit dem Quadrol-Programm 30 Schritte abgebaut (Sequenzierschema Abb. 33).

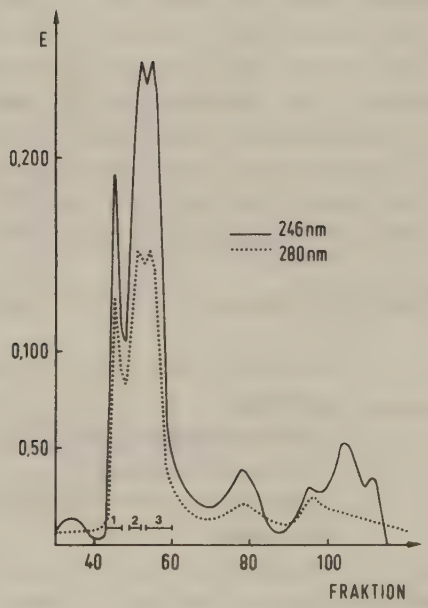


Abb. 31 Trennung des Peptidgemisches nach der Spaltung am Tryptophan der $ß_A$-Ketten
Säule: Sephadex G-50 fine (2,5x100cm)
Puffer: 9%ige Ameisensäure
Durchflußrate: 10ml/h
Fraktionsvolumen: 5ml/30Min

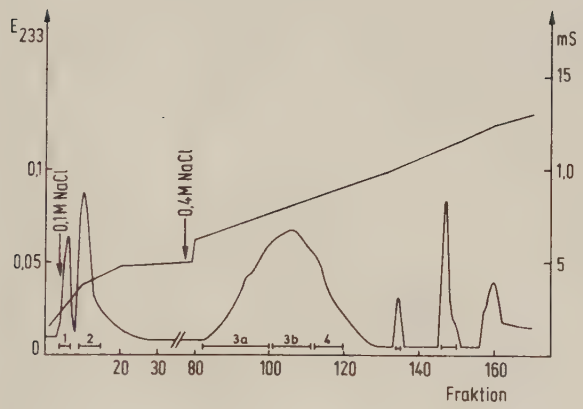


Abb. 32 Rechromatographie des Gipfels Nr. 3 auf Ionenaustauscher

Säule: CM-Sepharose Cl 6B (1,5x8cm)

Äquilibrierpuffer: 0,05M Essigsäure mit 8M Harnstoff pH 4,5

Bis Fraktion 55 wurde die Säule mit 150ml 0,1M NaCl in Äquilibrierpuffer eluiert. Danach wurde ein linearer Gradient ausgelegt: 200ml 0,1M NaCl in Äquilibrierpuffer
200ml 0,4M NaCl in Äquilibrierpuffer

Durchflußrate: 9ml/h

Fraktionsvolumen: 3ml/20Min

Tabelle VIII - Aminosäureanalyse der tryptischen Peptide, des Pro-Peptids und der $ß_A$-Kette des Lungenfisches

Amino-säure	Tryptische Peptide															
	Tp1	Tp2	Tp3	Tp4a	Tp4b	Tp5a	Tp5b	Tp6+7	Tp8+9a	Tp9b	Tp10	Tp11	Tp12a	Tp12b	Tp13a	Tp13b
Asp	1,15		2,87			2,17	2,05			0,94	1,01	2,13				1,02
Thr			1,18	0,70					1,12						1,18	
Ser		2,01				3,42		1,09			2,11					
Glu	2,05	1,21	1,18						1,09		1,02		1,07	1,06	2,37	1,08
Pro				1,26		1,06						1,05			0,84	
Gly			1,13			1,74		1,11		0,99	0,97		0,91	1,08		
Ala	1,07		1,22			0,87		1,01	2,13		1,00			2,68		1,04
Cys									0,56				N.B.			
Val	0,81	1,81	1,80	1,89				0,93	0,95			0,93	1,10			
Met																
Ile		0,77	1,11	0,95		1,07			0,93*	0,85				0,92		
Leu			1,19	1,04		0,95			1,06		3,00	0,97	1,91	2,15		
Tyr		0,98				0,89										0,73
Phe		1,07		1,25		2,14				1,03		1,08		1,05	1,18	1,09
Try	N.B.			N.B.												
Lys	1,13	1,14		0,91		1,07	1,14		1,04	0,90	1,00			1,09		1,13
His	0,95		1,07				0,79	0,99		0,98	2,95	1,97				
Arg			1,15		1,00			0,95	0,99			0,93	0,93		1,18	
Summe	7+1	9	13	8+1	1	15	4	6	10+1	6	13	9	7	10	6	6

* Die Werte beziehen sich auf die 20 Stunden-Hydrolyse

** Die Werte in Klammern wurden aus der Sequenz entnommen

N.B. = nicht bestimmt

Tp14	Tp15	Pro-Peptid (Pos.100-147)	$ß_A$-Kette
1,78(1)**		4,30	14,58
		1,28	3,99
2,04		2,07	10.94
	1,25	5,65	12,56
		2,12	3,98
0,93		2,93	9,21
		4,13	11,39
		0,63	0,96
0,72		2,09	11,59
N.B.		0,96	1,39
0,54		1,95	8,38
1,11		4,73	13,29
	0,95	1,71	3,79
0,94		4,39	9,87
			2,24
		2,27	10,26
1,18	0,82	2,69	11,88
0,91		3,77	8,35
12-1	3	48	147

III.D.5. Die Sequenz der β_A-Ketten des Lungenfisches

Die Sequenz der β_A-Ketten wurde durch den N-terminalen Abbau der Kette (42 Schritte), durch das Pro-Peptid (Pos 100-147), die tryptischen Peptide sowie durch das Überlappungspeptid (Pos 38-147) von der Spaltung am Tryptophan aufgeklärt. Die Zuordnung der tryptischen Peptide erfolgte meist aufgrund der Homologie zu den ß-Ketten vom Menschen und Karpfen. Das Sequenzierschema (Abb.33) gibt die vollständige Sequenz der β_A-Kette mit den Teilsequenzen der isolierten Peptide wieder. Die Analysen sind in Tab. VIII wiedergegeben.

Abb. 33 - Sequenzierschema der β_A-Ketten des Lungenfisches

10 20

Val-His-Trp-Glu-Asp-Ala-Glu-Lys-Gln-Tyr-Ile-Val-Ser-Val-Phe-Ser-Lys-Ile-Asp-Val-Asp-His-Val-Gly-Ala-Asn-Thr-Leu-Glu-

Kettenlauf

Tp 1 Tp2 Tp3

30 40 50

Arg-Val-Leu-Ile-Val/Ala-Phe-Pro-Trp-Thr-Lys-Arg-Tyr-Phe-Asn-Ser-Phe-Gly-Asp-Leu-Ser-Ser-Pro-Gly-Ala-Ile-Lys-His-Asn-Asn-

Kettenlauf

Tp4a Tp 4b Tp5a Tp5b

Tryptophan-Peptid

60 65 83

Lys-Val-Ser-Ala-His-Gly-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Ala-Ile-Ile-Glu-Cys-Thr-Arg-His-Phe-Gly-Asn-Ile-Lys-Gly-His-Leu-Ala-Asn-

Tp 6+7 Tp8 Tp9a Tp 9b Tp10

Tryptophan-Peptid

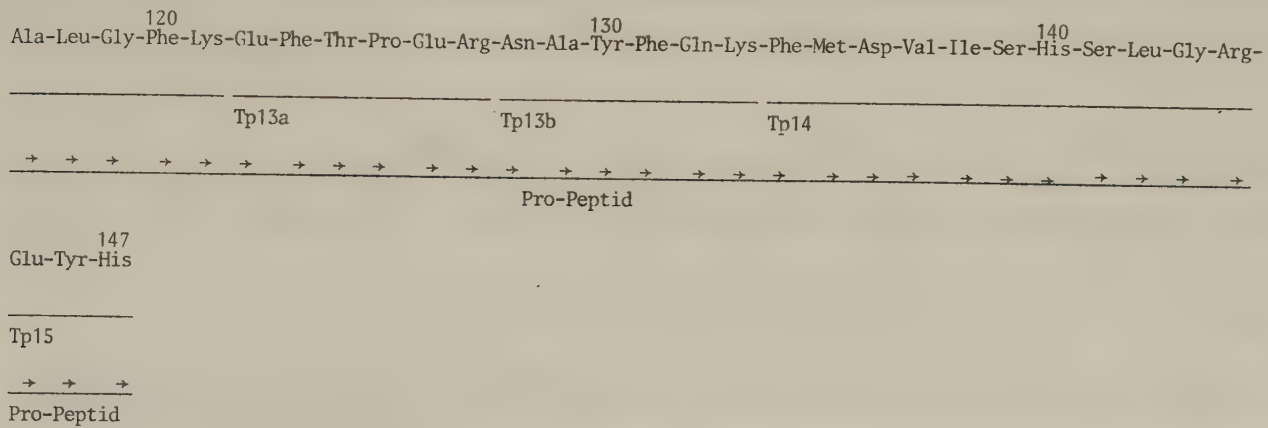
90 100 110

Leu-Ser-His-Leu-His-Ser-Glu-Lys-Leu-His-Val-Asp-Pro-His-Asn-Phe-Arg-Val-Leu-Gly-Gln-Cys-Leu-Arg-Ile-Glu-Leu-Ala-Ala-

Tp 11 Tp12a Tp12b

Pro-Peptid

Fortsetzung von Abb. 33:



IV. D I S K U S S I O N

IV.A. Homologe Zuordnung der α- und ß-Ketten des Goldfisch-Hämoglobins zu dem Human-Hämoglobin

Der Goldfisch oder die Goldkarausche (Gattung Carassius, Unterfamilie Karpfen) wurde in China durch lange und wiederholte Auslese aus der Silberkarausche gezüchtet und ist heute in der ganzen Welt verbreitet.
Die Polyacrylamidgel-Elektrophorese (pH 8,3) zeigte im Goldfischhämolysat nur eine Hämoglobinkomponente. Dieses Protein ist tetramer und hat dieselbe elektrophoretische Mobilität wie die dritte Komponente "C" des Karpfens (1) (Abb. Nr. 1).
Eine einzige Hämoglobinkomponente beim Goldfisch fanden auch Vaccaro Torracca et. al. (8, 9,). Bei Fischen ist diese Tatsache eher eine Ausnahme.
Die vollständigen Sequenzen der α- und ß-Ketten des GF-Hämoglobins sind in Abb. 34 und 35 homolog zu den α- und ß-Human- und Karpfen Ketten wiedergegeben. Wie ersichtlich, sind die GF-Ketten um eine Aminosäure länger als die Human-Ketten: 142 bzw. 147 Aminosäurereste. Die α-Ketten enthalten 5 Histidin-, 4 Methionin- und 2 Tryptophan-Reste, aber kein Cystein, bei den ß-Ketten hingegen werden 4 Cystein-, 5 Methionin-, 4 Histidin- und 4 Tryptophan-Reste gefunden. In den α-Ketten wurden in α47 (CD5) und in α53 (E2) zwei Aminosäuren gleichzeitig gefunden: Ala + Ser bzw. Gly + Ala. Der N-Terminus der GF-α-Ketten ist mit Acetyl blockiert.
Beim homologen Vergleich der Sequenzen von Human- (4, 10, 11) und GF-Hämoglobin findet man 66 (47%) Unterschiede in den GF-α-Ketten und 72 (51%) in den GF-ß-Ketten. Die Verteilung dieser Austausche ist unregelmäßig. Man kann aber in den beiden Ketten eine Häufung der Mutationen in den E-, G- und H-Helices feststellen.
Beide GF-Ketten haben je eine Aminosäure mehr als die entsprechenden Human-Ketten; d.h. beide Ketten sind um eine Insertion länger. Aus Gründen der Homologie sollte diese in der GF-α-Kette in Pos 47 (CD5) und in der GF-ß-Kette in Pos 119 (GH3) liegen. Eine solche Insertion bzw. Deletion als Mutationstyp

Abb. 34 - Homologe Zuordnung der Ketten des Goldfisches zu den Human-Ketten

In den Positionen 47 und ß 119 ist in den Human-Ketten je eine Deletion vorhanden.

10 20
H α Val Pro-Ala Thr-Asn Ala Gly Val Ala-His Gly Tyr
GF α Ac-Ser- -Leu-Ser-Asp-Lys-Asp-Lys-Ala-Val-Val-Lys-Ala-Leu-Trp-Ala-Lys-Ile-Gly-Ser-Arg-Ala-Asp-Glu-Ile-Gly-Ala-
GFß Val-Glu-Trp-Thr-Asp-Ala-Glu-Arg-Ser-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Trp-Gly-Lys-Leu- -Asn-Pro-Asp-Glu-Leu-Gly-Pro-
H ß His-Leu Pro-Glu Lys Val-Thr-Ala Val Val Val Gly-
10 20

30 40 50
Glu Phe-Leu-Ser-Phe Thr Pro Phe His
Glu-Ala-Leu-Gly-Arg-Met-Leu-Thr-Val-Tyr-Pro-Gln-Thr-Lys-Thr-Tyr-Phe-Ser-His-Trp- -Ala/Ser-Asp-Leu-Ser-Pro-
Gln-Ala-Leu-Ala-Arg-Cys-Leu-Ile-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Tyr-Phe-Ala-Thr-Phe-Gly-Asn-Leu-Ser-Ser-Pro-Ala-Ala-
Glu Gly Leu Val Phe Glu-Ser Asp Thr Asp
30 40 50

60 70
Ala-Gln Gly Lys-Val-Ala-Asp Leu-Thr-Asn Ala-His-Val Met-
-Gly-Ser-Ala/Gly-Pro-Val-Lys-Lys-His-Gly-Lys-Thr-Ile-Met-Gly-Ala-Val-Gly-Asp-Ala-Val-Ser-Lys-Ile-Asp-Asp-Leu-
Ile-Met-Gly-Asn-Pro-Lys-Val-Ala-Ala-His-Gly-Arg-Thr-Val-Met-Gly-Gly-Leu-Glu-Arg-Ala-Ile-Lys-Asn-Met-Asp-Asn-Ile-
Val Lys Lys-Lys Leu Ala-Phe-Ser-Asp-Gly-Leu-Ala-His-Leu Leu
60 70 80

80 90 100
Pro-Asn Asp His Val Val Leu Ser Cys-
Val-Gly-Ala-Leu-Ser-Ala-Leu-Ser-Glu-Leu-His-Ala-Phe-Lys-Leu-Arg-Ile-Asp-Pro-Ala-Asn-Phe-Lys-Ile-Leu-Ala-His-Asn-
Lys-Ala-Thr-Tyr-Ala-Pro-Leu-Ser-Val-Met-His-Ser-Glu-Lys-Leu-His-Val-Asp-Pro-Asp-Asn-Phe-Arg-Leu-Leu-Ala-Asp-Cys-
Gly Phe Thr Glu-Leu- Cys-Asp Glu Gly-Asn-Val-
90 100

Fortsetzung von Abb. 34:

```
                 110                                                  120                                                  130
Leu-Leu     Thr-Leu-Ala-Ala-His-Leu         Ala-Glu             Ala         Ala     Leu                 Leu-Ala-
Val-Ile-Val-Val-Ile-Gly-Met-Leu-Phe-   -Pro-Gly-Asp-Phe-Thr-Pro-Glu-Val-His-Met-Ser-Val-Asp-Lys-Phe-Phe-Gln-
Ile-Thr-Val-Cys-Ala-Ala-Met-Lys-Phe-Gly-Pro-Ser-Gly-Phe-Asn-Ala-Asp-Val-Gln-Glu-Ala-Trp-Gln-Lys-Phe-Leu-Ser-
Leu-Val-Cys-Val-Leu     His-His             Lys-Glu     Thr-Pro-Pro         Ala     Tyr         Val-Val-Ala-
110                                     120                                     130


                                 140
Ser-Val-Ser-Thr-Val     Thr-Ser
Asn-Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Ser-Glu-Lys-Tyr-Arg
Val-Val-Val-Ser-Ala-Leu-Cys-Arg-Gln-Tyr-His
Gly     Ala-Asn         Ala-His-Lys
            140
```

Abb. 35 - Homologe Zuordnung der GF-Ketten zu den Karpfen-Ketten

K α
GF α Ac-Ser- -Leu-Ser-Asp-Lys-Asp-Lys-Ala-Val-Val-Lys-Ala-Leu-Trp-Ala-Lys-Ile-Gly-Ser-Arg-Ala-Asp-Glu-Ile-Gly-Ala-
GFß Val-Glu-Trp-Thr-Asp-Ala-Glu-Arg-Ser-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Trp-Gly-Lys-Leu- Asn-Pro-Asp-Glu-Leu-Gly-Pro-
K ß$_A$

10 Ala Ile-Ala 20 Ser-Pro-Lys- Asp

10 20

30 40 50

Ala

Glu-Ala-Leu-Gly-Arg-Met-Leu-Thr-Val-Tyr-Pro-Glu-Thr-Lys-Thr-Tyr-Phe-Ser-His-Trp- -Ser/Ala-Asp-Leu-Ser-Pro-
Gln-Ala-Leu-Ala-Arg-Cys-Leu-Ile-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Tyr-Phe-Ala-Thr-Phe-Gly-Asn-Leu-Ser-Ser-Pro-Ala-Ala-
Glu

Phe Ser-Tyr

30 40 50

60 70

(Lys,His,Gly,Lys)Val

Gly-Ser-Ala/Gly-Pro-Val-Lys-Lys-His-Gly-Lys-Thr-Ile-Met-Gly-Ala-Val-Gly-Asp-Ala-Val-Ser-Lys-Ile-Asp-Asp-Leu-
Ile-Met-Gly-Asn-Pro-Lys-Val-Ala-Ala-His-Gly-Arg-Thr-Val-Met-Gly-Gly-Leu-Glu-Arg-Ala-Ile-Lys-Asn-Met-Asp-Asn-Ile-

Glu Met Asp

60 70 80

Fortsetzung von Abb. 35

```
        80                                      90                                      100
        Gly     Ala-Ser                         Ser             Val                                     Asn-His-
Val-Gly-Ala-Leu-Ser-Ala-Leu-Ser-Glu-Leu-His-Ala-Phe-Lys-Leu-Arg-Ile-Asp-Pro-Ala-Asn-Phe-Lys-Ile-Leu-Ala-His-Asn-
Lys-Ala-Thr-Tyr-Ala-Pro-Leu-Ser-Val-Met-His-Ser-Glu-Lys-Leu-His-Val-Asp-Pro-Asp-Asn-Phe-Arg-Leu-Leu-Ala-Asp-Cys-

                                90                                      100
                110                                     120                                     130
Ile-Val     Gly     Met-Phe-Tyr-Leu                     Pro
Val-Ile-Val-Val-Ile-Gly-Met-Leu-Phe-    -Pro-Gly-Asp-Phe-Thr-Pro-Glu-Val-His-Met-Ser-Val-Asp-Lys-Phe-Phe-Gln-Asn-
Ile-Thr-Val-Cys-Ala-Ala-Met-Lys-Phe-Gly-Pro-Ser-Gly-Phe-Asn-Ala-Asp-Val-Gln-Glu-Ala-Trp-Gln-Lys-Phe-Leu-Ser-Val-
                                                        Ser-Pro-Asn
110                                     120                                     130

                                140
Leu-Ala-Leu-Ala-Leu-Ser-Glu-Lys-Tyr-Arg
Val-Val-Ser-Ala-Leu-Cys-Arg-Gln-Tyr-His
        Asn         Lys
        140
```

wurde bereits beim Vergleich der α- und ß-Ketten von Human-Hämoglobin als Erklärung herangezogen (11).
Im Vergleich mit den Ketten des Karpfen-Hämoglobins (3,5) ist die Zahl der Austausche erwartungsgemäß viel kleiner: Es werden 24 (17%) Unterschiede bei den GF-α-Ketten und 13 (8% → $ß_A$ Karpfen) bzw. 10 (7% → $ß_B$ Karpfen) bei den GF-ß-Ketten gefunden. Gehäuft treten Mutationen in den GF-α-Ketten am Ende der G-Helix (α 104- α 113, 8 Austausche) auf.

Die Struktur des Moleküls ist durch zahlreiche und verschiedene Bindungsstellen untereinander, zwischen den Untereinheiten und der prosthetischen Gruppe sowie auch zwischen dem Molekül und den allosterischen Effektoren stabilisiert und/oder modifiziert. Beim Human-Hämoglobin wurden alle diese Bindungsstellen eindeutig identifiziert (12-19). Im Gegensatz dazu wurde keine Röntgen-Analyse eines tetrameren Fisch-Hämoglobins erstellt und auch nicht die Bindungsstellen der allosterischen Effektoren bestimmt.
Wie aus der Tab. IX ersichtlich ist, sind 7 von 16 (α_1 $ß_1$) Bindungsstellen (12, 14, 15) verändert. Davon sind 3 Mutationen isopolar: C1 Phe → Tyr; G17 Ala → Gly; GH3 Ala → Gly.
In den GF-ß-Ketten werden 8 Reste (aus 16 Resten) ausgetauscht; (ein einziger Austausch ist konservativ: ßB15 Val → Ile).
Wahrscheinlich bilden sich beim GF-Hämoglobin andere neue Salz- und H-Brücken als beim Human-Hämoglobin, die ihren Beitrag zur Stabilität der Quartär-Struktur des Moleküls leisten, ohne es räumlich zu verändern.

Die Bindungsstellen an den Kontaktflächen α_1 $ß_2$ (oder α_2 $ß_1$) von Human- (12, 15) und GF-Hämoglobin (bzw. anderen Fisch-Hb) sind in den Tabellen X und XI wiedergegeben. Viele von den Kontakt-Resten sind in der ligandierten und unligandierten Form identisch.Die Zahl der Austausche ist in den GF-α-Ketten (drei in der Oxy-und drei in der Deoxy-Form)größer als die in den

Tabelle IX - α_1 β_1 Bindungsstellen

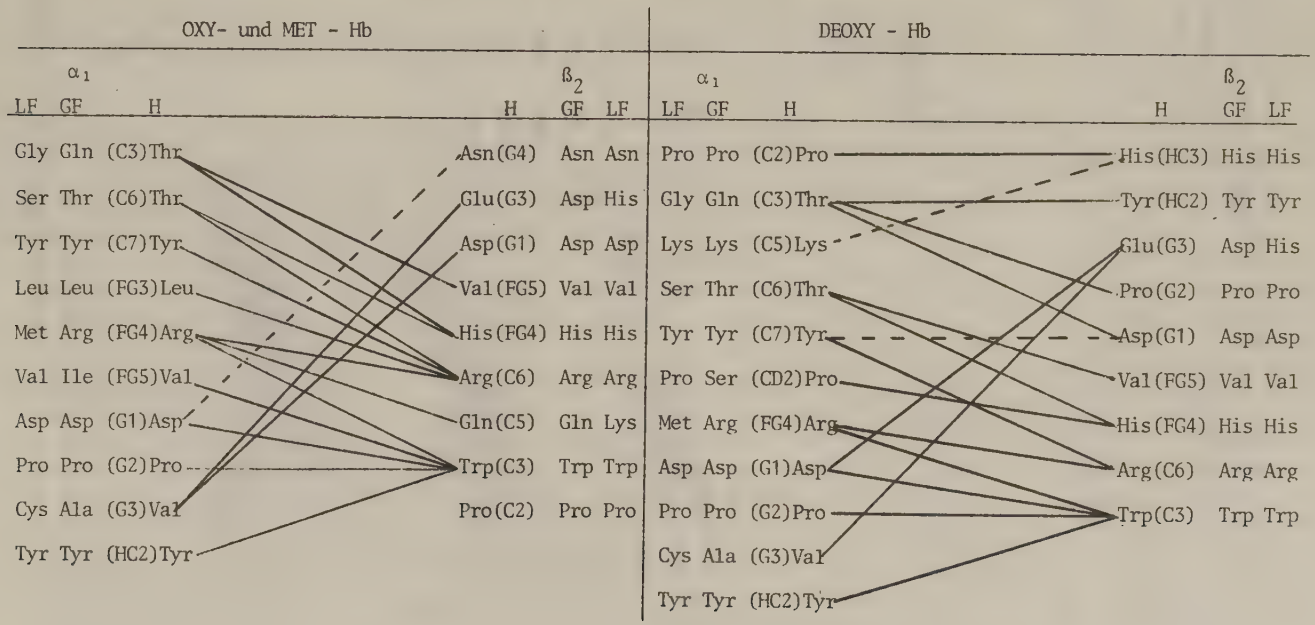
	α_1					β_1	
LF	GF	H		H		GF	LF
Arg	Arg	B12	Arg	Gln	H9	Gln	Glu
Ser	Thr	B15	Leu	Ala	H6	Glu	Ala
Asp + Cys	Val	B16	Ser	Gln	H5	Gln	Gln
Tyr	Tyr	C1	Phe	Pro	H3	Asp	Gln
Glu	His	G10	His	Pro	H2	Ala	Pro
Thr	Val	G14	Val	Thr	H1	Asn	Ala
Ala	Gly	G17	Ala	Phe	GH5	Phe	Phe
Ala	Met	G18	Ala	Gly	GH2	Gly	Gly
Gly	Pro	GH2	Pro	His	G18	Met	Ala
Glu	Gly	GH3	Ala	Ala	G17	Ala	Ala
Phe	Phe	GH5	Phe	Cys	G14	Val	Ile
Thr	Thr	H1	Thr	Asn	G10	Asp	Gln
Pro	Pro	H2	Pro	Tyr	C1	Tyr	Phe
Asn	His	H5	His	Val	B16	Val	Val + Ala
?	Met	H6	Ala	Val	B15	Ile	Ile
Glu	Asp	H9	Asp	Arg	B12	Arg	Arg

H - Human

GF - Goldfisch

LF - Lungenfisch

Tabell X - α_1 β_2 Bindungsstellen



H - Human
GF - Goldfisch
LF - Lungenfisch

Tabelle XI - $\alpha_1 \beta_2$-Bindungsstellen verschiedener Fisch-Hämoglobine im Vergleich mit Human(H)-Hämoglobin

OXY - FORM

α_1						β_2					
Pos. in H	H	LF	GF	K	FIV	Pos. in H	H	β_A LF	GF	K_A K_B	FIV
C3	Thr	Gly	Gln	Gln	Gln	G4	Asn	Asn	Asn	Asn	Gln
C6	Thr	Ser	Thr	Thr	Ala	G3	Glu	His	Asp	Asp	Asp
C7	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	G1	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
FG3	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	FG5	Val	Val	Val	Val	Val
FG4	Arg	Met	Arg	Arg	Arg	FG4	His	His	His	His	His
FG5	Val	Val	Ile	Val	Val	C6	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
G1	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	C5	Gln	Lys	Gln	Gln	Gln
G2	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	C3	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp
G3	Val	Cys	Ala	Ala	Thr	C2	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
HC2	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr						

DEOXY - FORM

α_1						β_2					
Pos. in H	H	LF	GF	K	FIV	Pos. in H	H	β_A LF	GF	K_A K_B	FIV
C2	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	HC3	His	His	His	His	His
C3	Thr	Gly	Gln	Gln	Gln	HC2	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
C5	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	G3	Glu	His	Asp	Asp	Asp
C6	Thr	Ser	Thr	Thr	Ala	G2	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
C7	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	G1	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
CD2	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	FG5	Val	Val	Val	Val	Val
FG4	Arg	Met	Arg	Arg	Arg	FG4	His	His	His	His	His
G1	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	C6	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
G2	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	C3	Trp	Trp	Trp	Trp	Trp
G3	Val	Cys	Ala	Ala	Thr						
HC2	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr						

LF - Lungenfisch

GF - Goldfisch

K - Karpfen

FIV - Forelle Komponente IV

GF-ß-Ketten (ein Austausch in der Oxy- und einer in der Deoxy-Form). Von den vier Austauschen sind drei isopolar:
FG5 Val → Ile, G3 Val → Ala und ßG3 Glu → Asp.
Die Aminosäuren: Trp 37 (ß) C3 und Tyr 42 (α) C7 haben eine besondere Bedeutung für die spektralen Eigenschaften des Human-Hämoglobins. Perutz et.al. (20, 21) haben bewiesen, daß eine Änderung der Spektren bei 287 nm den Übergang von einer Form zu der anderen (R →T) bzw. die strukturelle Modifizierung der $\alpha_1\beta_2$ - Bindungsstellen anzeigt. Beide Reste sind im GF-Hämoglobin wie auch in den anderen Fisch-Hämoglobinen vorhanden. Chien et.al. (22) haben die Circular-Dichroismus-Spektren (C.D.S.) des Karpfen-Hämoglobins zwischen pH 6,4-8,0 für die Deoxy-Form und pH 7-8 für die Oxy-Form bestimmt. Es wurde ein Übergang des Karpfen-Hämoglobins von der T zur R Struktur festgestellt. Interessant ist, daß im Karpfen- sowie auch im GF-Hämoglobin im Vergleich zum Human-Hb in den ß-Ketten alle Aminosäuren der Kontaktflächen $\alpha_1\beta_2$ erhalten sind. In den α-Ketten vom Karpfen und GF sind (Tab. XI) C3 Thr zu Gln $\{^{K}_{GF}$, CD2 Pro zu Ala (Karpfen) Ser (GF),G3 Val zu Ala $\{^{K}_{GF}$ und FG5 Val zu Ile (GF) mutiert.
Aus diesem Vergleich könnte man zwei Schlußfolgerungen ziehen:

a) Da die Aminosäuren der Bindungsstellen $\alpha_1\beta_2$ in den beiden Fisch-Hb mit wenigen Ausnahmen enthalten blieben, könnten die C.D.S. dieselben Informationen über die Quartär-Struktur-Änderungen des Karpfen- bzw. GF-Hbs liefern, wie im Falle des Human-Hbs.
b) Die Wechselwirkung der tetrameren Untereinheiten sollten in allen drei Proteinen (K,GF und Human) die gleichen sein.

Die konformationelle Änderung des Karpfen-Hbs bei der Oxygenierung ist auch durch die "spin-label" Technik festzustellen (22). (Diese Technik wurde für das Studium der strukturellen Übergänge der allosterischen Proteine verwendet (23)). In vertebraten Hämoglobinen werden durch die Oxygenierung die e.p.r. Spektren des ß93 Jodacetamidnitroxyl-Cystein-Hämoglobins verändert (22). Die e.p.r. spektralen Änderungen des Karpfen-Hbs sind fast gleich mit denen vom Pferd-Hb (22). Beim Karpfen- sowie auch beim GF-Hb ist aber das ß93-Cys (F9) durch Serin ersetzt. Also muß in diesen beiden Fisch-Hämoglobinen ein anderer Cysteinrest vorhanden sein,

Tabelle XII - Häm-Bindungsstellen

α -Kette						ß-Kette					
Pos. in H	H	LF	GF	K	FIV	Pos. in H	H	$ß_A$ LF	GF	K_A / K_B	FIV
C7	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	C7	Phe	Tyr	Tyr	Tyr/Phe	His
CD1	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	CD1	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe
CD3	His	His	His	His	His	CD4	Phe	Phe	Phe	Phe/Tyr	
CD4	Phe	Phe	Trp	Trp	Trp	E7	His	His	His	His	His
E7	His	His	His	His	His	E10	Lys	Lys	Thr	Thr	Thr
E10	Lys	Lys	Thr	Val		E11	Val	Val	Val	Val	Val
E11	Val	Val	Ile	Ile		E14	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly
F4	Leu	Leu	Leu	Leu		E15	Phe	Ile	Leu	Leu	Leu
F7	Leu	Lys	Leu	Leu		F4	Leu	Leu	Leu	Leu	
F8	His	His	His	His		F7	Leu	Leu	Met	Met	
FG3	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	F8	His	His	His	His	
FG5	Val	Val	Ile	Val	Val	FG3	Leu	Leu	Leu	Leu	
G4	Asn	Asn	Asn	Asn		FG5	Val	Val	Val	Val	Val
G5	Phe	Phe	Phe	Phe		G4	Asn	Asn	Asn	Asn	
G8	Leu	Leu	Leu	Leu		G5	Phe	Phe	Phe	Phe	
H12	Leu	Leu	Phe	Phe		G8	Leu	Leu	Leu	Leu	
H15	Val	Ile	Leu	Leu		H15	Val	Ile	Val	Val	
H19	Leu	Leu	Leu	Leu		H19	Leu	Leu	Leu	Leu	

der den Sulhydrylreagenzien sowie auch dem konformationellen Übergang zugänglich ist. Die ß-Ketten des GF und die $ß_B$-Kette des Karpfens enthalten vier Cysteinreste, die $ß_A$ nur drei (3). (Die α-Ketten beider Fisch-Hämoglobine haben keine Cysteine). Von diesen Cysteinresten kommen (B13) ß31 und (H21) ß143 in Frage. Cystein ßB13 liegt im Bereich der B-Helix extern und könnte für die leichte Oxidierbarkeit der Moleküle verantwortlich sein. Cystein ß143 liegt in der Tasche zwischen Helices F und H, sehr nahe dem C-Terminus. Dieser Bereich verändert sich deutlich bei dem Übergang von einer Form zu der anderen, wie in der Röntgen-Analyse an Human-Hämoglobin gezeigt werden konnte (15). Ein "spin-label attached" an diesem Cystein könnte die oben genannten Änderungen nachweisen.

Die Reste Tyr α C7 und Asp ßG1, die im Human-Deoxy-Hämoglobin eine wichtige H-Brücke bilden, sind im GF-Hb ebenfalls vorhanden. Die andere wichtige H-Brücke in der Human-Oxy-Form zwischen Asp αG1 und Asn ßG4 könnte in GF-Hämoglobine ebenfalls gebildet werden, da diese Aminosäuren nicht ausgetauscht sind. In der Human-Deoxy-Form tritt Asp ßG1 außer mit Tyr α C7 auch mit Thr α C3 in Wechselwirkung. Diese Aminosäure ist in allen bis jetzt untersuchten Fisch-Hämoglobinen mutiert (Tab. XI) (Thr → Gln beim GF oder Gly beim LF). Wahrscheinlich werden im GF-Hb die Wechselwirkungen zwischen den Resten, Val ßFG5, His ßFG4 (Oxy-Form) und Tyr ßHC2, Pro ßG2 und Asp ßG1 (Deoxy-Form) aufgehoben.

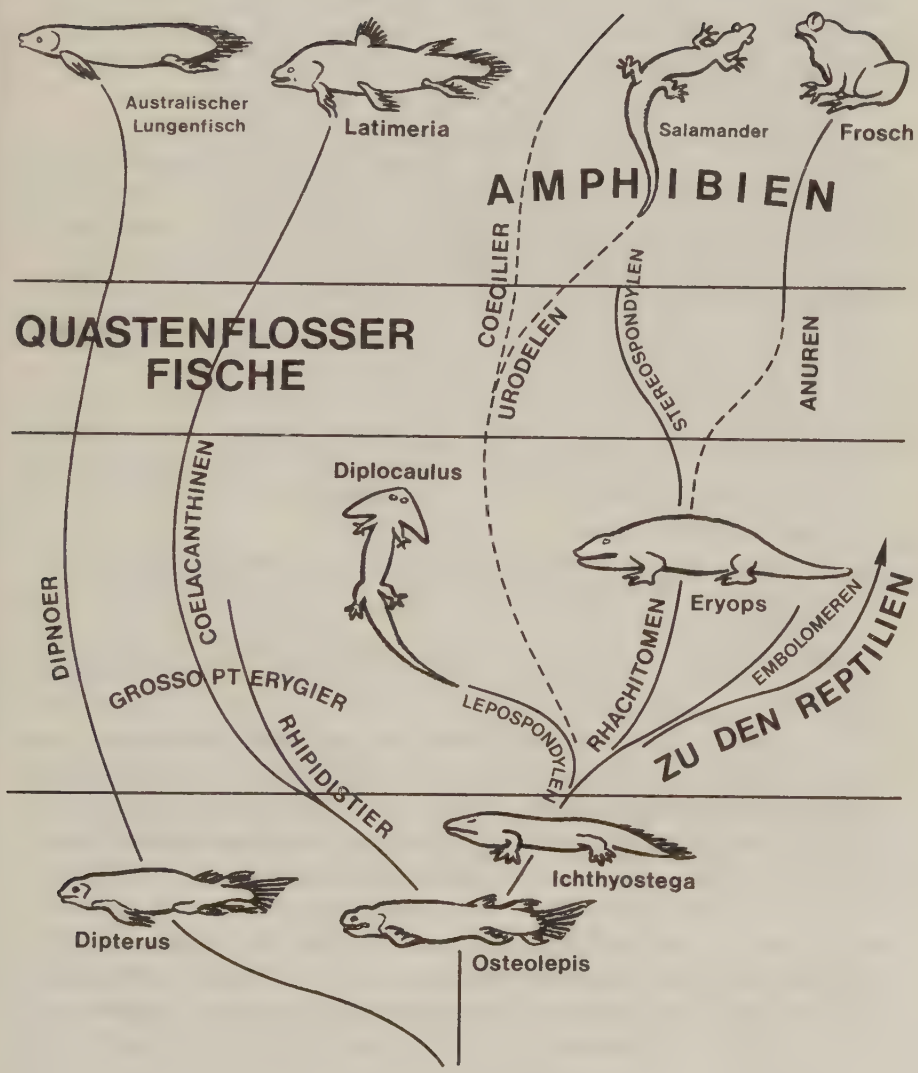
In den Human-Ketten steht die Häm-Gruppe mit 16 Seitenketten (d.h. 30 Atomen und 75 Bindungsstellen) in unmittelbarem Kontakt (12) (Tab. XII). Bis auf zwei sind alle diese Seitenketten apolar. Die beiden Ausnahmen sind die Seitenketten der Histidine E 7 und F 8, die aus Imidazol-Ringen bestehen und bei der Sauerstoff-Bindung eine wichtige Rolle spielen. Im GF-Hämoglobin ist diese Aminosäure in beiden Positionen vorhanden. Fermi (16) entdeckte in der Human-α-Häm-Tasche der Deoxy-Form ein Wasser-Molekül, das mit dem Pyrol-Ring II des Häms und mit dem C (γ_2) des Valins E11 eine van der Waals-Bindung und mit dem

$N_{(\varepsilon)}$ des distalen His E7 eine H-Brücke bildet. Val E11 ist in den GF-Ketten mit Ile ausgetauscht (Tab. XII). Obwohl bis heute keine Fourier-Synthese eines Fisch-Hämoglobins gemacht wurde und auch nicht festgestellt werden konnte, ob das Wasser-Molekül auch in einem derartigen Hämoglobin existiert, könnte der Austausch Val → Ile (auch in den α-Ketten vom Karpfen vorhanden) eine besondere Bedeutung haben. Isoleucin, obgleich isopolar mit Valin, ist um eine CH_2-Gruppe länger, was die Abstände innerhalb der α-Häm-Tasche, sowie auch die oben genannten Bindungsstellen verändern könnte. In den GF-ß-Ketten steht in Position E11 (Tab. XII) Valin wie in den Human-Ketten.
Die Human Deoxy-ß-Häm-Tasche enthält kein Wasser (16). Die Abwesenheit dieses Moleküls wurde durch den kleineren Abstand (1, 9Å gegenüber 3,8Å für α E11) zwischen der γ_2-Methyl-Gruppe des ßVal E11 und dem Häm erklärt (15,16). Valin blockiert in den ß-Ketten den Weg des Liganden. Bevor das Eisen-Atom des Häms mit einem Liganden reagieren kann, muß das Wasser-Molekül aus der α-Häm-Tasche verdrängt werden und das blockierende ßVal E11 seine Position verändern.
Zwei andere Aminosäuren in den Deoxy Human-Ketten Val FG5 und Leu F7 sind für die Häm-Häm und Häm-Protein Wechselwirkung (16) besonders wichtig. Val FG5 bestimmt die Position der Vinyl II Gruppen des Häms. Diese liegen in den Deoxy-Human-Ketten 2,8Å für α und 3,9Å für ß oberhalb der Porphyrin-Ebene und haben eine Wechselwirkung mit der γ_1-MethylGruppe des Valins.
Leu F7 ist im Kontakt mit dem α-Kohlenstoff der Propionsäure des Häms (Deoxy-Form). Während der Oxygenierung des Hbs wird die Neigung des Häms verändert. Diese Änderung wird dem Leu F7 übermittelt. Beim Goldfisch sind α-Val FG5 mit Ile und ß-Leu F7 mit Met ausgetauscht. Außer den bis jetzt diskutierten Austauschen kommen bei dem Häm-Bindungsstellen noch folgende mutierte Aminosäuren vor (Tab. XII):

Human	Goldfisch	Human	Goldfisch
α-Phe CD4	Trp	ß-Leu B13	Cys
α-Lys E10	Thr	ß-Phe C7	Tyr
α-Val H15	Leu	ß-Lys E10	Thr
		ß-Ala E14	Gly
		ß-Phe E15	Leu

IV.B. Lungenfischhämoglobin

Die Entdeckung kaum einer Tierart hat soviel Aufsehen erregt wie die des südamerikanischen Lungenfisches. Das Vorhandensein des ausgeprägten Fisch- wie auch amphibischen Charakters beweist bei diesem Tier die Similarität der Entwicklung der lebenden Lungenfische und Amphibien während des Überganges vom im wasseratmenden zum luftatmenden Leben. Die besonderen Eigenschaften zeigt auch sein Name: "Lepidosiren paradoxus"
Er ist ein obligatorischer Luftatmer. Außer dem amerikanischen Lungenfisch existieren heute nur noch zwei andere Gattungen: Protopterus in Afrika und Epiceradotus in Australien. Der australische Lungenfisch, der dem Lungenfisch der Triaszeit sehr ähnelt, ist sicher der primitivste der drei modernen Typen. Dieser Fisch kann nicht außerhalb des Wassers leben, atmet mit den Kiemen und gebraucht seine Lunge nur als Hilfsatmungsorgan während der trockenen Jahreszeit, wenn der pO_2 des Wassers sehr niedrig wird. Die südamerikanischen und afrikanischen Lungenfische andererseits können monatelang außerhalb des Wassers überleben. Zu Beginn der trockenen Jahreszeit wühlen sie sich in den Schlamm ein und enzystieren sich. Sie atmen durch eine oder mehrere Öffnungen zur Außenluft. Diese beiden Lungenfische gebrauchen ihre Lungen funktionell, während die Kiemen nur der Absonderung des CO_2 dienen.
Daß diese Tiere, wie alle anderen Fische, mit einem sehr variablen Sauerstoffdruck und im allgemeinen unter sehr variablen Bedingungen leben müssen, führte zu verschiedenen Anpassungsstrategien. Im Devon (vor mehr als 350 Millionen Jahren) vollzog sich der wichtigste Schritt in der Evolution der Wirbeltiere, der Übergang vom Wasser- zum Landleben. Die Fähigkeit der Lungenfische, Luft zu atmen, läßt sicherlich Raum für die Vermutung, daß ein intermediäres Stadium zwischen Fischen und landlebenden Wirbeltieren vorliegt. Trotz solcher Spezialisation bei den Lungenfischen auf eine Methode, nämlich außerhalb des Wassers zu leben, sprechen doch alle Beweise dafür, daß diese Tiere nicht die Vorfahren der landlebenden Wirbeltiere sein können. Die Lungenfische haben sich als Seitenzweige der zentralen Dipnoer-Evolution entwickelt und werden als lebende Fossilien bezeichnet (Abb. 36).



b. 36 – Evolution der Quastenflosser-Fische und der Amphibien.

Trotz ihrer interessanten Evolution wurde das Hämoglobin dieser Fische erst in den letzten Jahren intensiver studiert. Das gereinigte Hämolysat der Erythrocyten des südamerikanischen Lungenfisches (LF) zeigt in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese bei pH 8,3 nur eine einzige Hämoglobinkomponente (Abb 18,19) mit einer der Human-Hämoglobin-Bande identischen Mobilität (0,66 + 0,01) (24,25). Sowohl bei der Kettentrennung des LF-Globins wie auch in der sauren Röhrchen-Elektrophorese (pH 3,5+Harnstoff) wurden aber drei Ketten isoliert. Eine der drei Ketten hat einen blockierten N-Terminus (B-Ketten); die anderen haben als Endgruppen Valin und Methionin. Die Primär-Struktur dieser beiden Ketten wurde in unserem Labor aufgeklärt. Die Val-Kette ist eine ß-Typ-, die Met-Kette eine α-Typ-Kette. Wenn man vom quantitativen Verhältnis der Ketten (B-Kette: $ß_A$-Kette: α-Kette = 1:2:3) ausgeht, liegt die Annahme nahe, daß die blockierte Kette (B-Kette) auch eine ß-Typ-Kette ($ß_B$) ist. Das Vorhandensein dreier Ketten im LF-Hämoglobin deutet auf zwei Möglichkeiten hin:

a) Entweder sind mindestens zwei Hämoglobin-Komponenten vorhanden, die aber mit der Elektrophorese nicht getrennt werden konnten,
b) oder es liegt ein asymmetrisches Hämoglobin vor, vom Typ: $\alpha_2 ß_A ß_B$

Das Vorkommen mutipler Hämoglobine ist bei den Fischen fast die Regel, obwohl die physiologische und die evolutionäre Bedeutung dieses Phänomens noch nicht aufgeklärt ist. Die Größe des Fischgenoms variiert erheblich, da sowohl Genduplikation, als auch Polyploidie weit verbreitet sind. Dieser Polymorphismus bewirkt Unterschiede zwischen den Hämoglobinen. Er könnte eine Folge der saisonalen Veränderungen sein oder eine Art von Anpassungsstrategie an die Umgebung,in der die Fische leben. Die Zahl wie auch die Eigenschaften dieser Hämoglobine sind von Art zu Art sehr verschieden.

Bonaventura et.al. (26) und Weber et.al. (27) versuchten eine Art Klassifizierung der Fischhämolysate aufzustellen:

Klasse I: Enthält eine oder mehrere Hämoglobin-Komponenten die pH-abhängig sind. Sie haben ähnliche, aber nicht unbedingt identische funktionelle Eigenschaften (Karpfen, Goldfisch, Perlmutterbarsch, Komoren-Quastenflosser, Plattfisch, Flunder, Schlammfisch).

Klasse II: Enthält multiple Hämoglobin-Komponenten mit sehr verschiedenem chromatographischem und elektrophoretischem Verhalten und unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften. Die Komponenten, die anodisch wandern, ähneln denen der Hämoglobine der ersten Klasse; die katodisch wandernden, sind bei Ligandierung pH- und Temperatur unabhängig (Forelle, Aal, Lachs, Sauger). Allerdings wurde die Temperaturabhängigkeit nur bei der Forelle näher untersucht.

Klasse III: Enthält Hämoglobine, die bei Ligandierung pH- aber nicht Temperatur abhängig sind (Makrele).

Die Lungenfischhämoglobine gehören wahrscheinlich der ersten Klasse an. Der afrikanische Lungenfisch Protopterus amphibius besitzt drei Hämoglobinkomponenten: zwei Haupt- und eine Nebenkomponente mit gleichen physiologischen Eigenschaften (28). Protopterus aethiopicus hat 4 Hämoglobin-Komponenten (29): zwei Haupt- und zwei Nebenkomponenten. Der Protopterus annectens besitzt nur ein Hämoglobin, das durch Isoleketrophokusierung nachgewiesen wurde (28). Das Hämolysat des australischen Lungenfisches wurde bis heute noch nicht auf die Anzahl der Hb-Komponenten oder der Globinketten geprüft. Eine weitere Untersuchung dieser Hämoglobine liegt noch nicht vor.
Für das Vorhandensein multipler Hämoglobin-Komponenten in den Fischen gibt es heute verschiedene Hypothesen, aber keine konnte experimentell bewiesen werden. Fischhämoglobine mit verschiedenen funktionellen Eigenschaften (Klasse II und III) sollten verschiedenen physiologischen Bedürfnissen gerecht werden, die etwa bei einer plötzlichen Änderung der äußeren Bedingungen oder unter Stress aufkommen. Die Hämoglobine der Klasse I könnten beim

Wachstum und bei der Entwicklung der Fische als Proteinspeicher eine Rolle spielen. So z.B. zeigten Fourie, van Vuren (30) und van Vuren, Hattingh (31) jahreszeitliche Änderungen in dem Verhältnis der Hämoglobin-Komponenten bei verschiedenen Süßwasserfischen. Dieses Verhältnis ändert sich bei Lachs und Aal auch während der Ontogenie (33,32). Beim afrikanischen Lungenfisch Protopterus aethiopicus nimmt die Hämoglobinmenge während der Trockenzeit,in der sich der Fisch einkapselt zu (von 7,4g% bis 11-13,5g%). Das Mengenverhältnis der Hb-Komponenten zueinander verschiebt sich (30). Johansen et.al. (34) fanden im Protopterus amphibius eine Erhöhung von fast 50% der Hb-Konzentration in der Einkapselungsphase, Weber et.al. (28) dagegen, daß sich das Verhältnis zwischen den drei Hämoglobin-Komponenten überhaupt nicht ändert. Bei den australischen und südamerikanischen Lungenfischen wurde diesem Problem nicht nachgegangen.

Asymmetrische Hämoglobine sind das erste Mal in den Heterozygoten der Human-Hämoglobin-Varianten vermutet worden (35). Experimentell bewiesen wurden sie aber erst 1973 von Macleod und Hill, nachdem die Autoren mit einem Vernetzungsreagenz das hybrid tetramer in dieser Form fixiert und isoliert hatten (36).
Bunn und McDonough demonstrierten 1974 die Existenz der Human-Deoxy-Hämoglobinhybriden (AS, AC), die als natürliche Produkte in einer Mischung vorlagen (37). Bei den Fischen kommen asymmetrische Hämoglobine relativ häufig vor: Bei dem atlantischen Lachs (38), dem Buntbarsch aus dem Rio Grande (39), dem Blaubandkärpfling (40), dem japanischen Aal (41), dem amerikanischen Aal (42) und bei den echten Welsen (43). Die Hybrid-Moleküle dieser Fische sind im Gegensatz zu den der Hybrid-Molekülen beim Menschen so stabil, daß sie ohne Vorbehandlung isoliert werden konnten. Der japanische Aal (41) weist zwei Typen von asymmetrischen Hybrid-Hämoglobinen auf. Soweit in der Literatur angegeben, ähnelt der eine von ihnen dem Fisch-Typ (stabiles Hybrid EIb), der andere dem Human-Typ (unstabiles Hybrid EIIb).

Wilhens (38) zeigte, daß einige anodische Hämoglobine des atlantischen Lachses Hybride vom Typ $\alpha_2\beta^x\beta^y$ sind. Die Hämoglobin-Komponenten II und III des Blaubandkärpflings scheinen Mischungen aus mindestens 6 asymmetrischen Hybriden desselben Typs zu sein (40).
Im Vergleich zu den Säugerhämoglobinen können die ungewöhnlich stabilen asymmetrischen Tetrameren als Charakteristikum für die Fischhämoglobine angesehen werden. Weil der Lungenfisch ausgeprägte Fischeigenschaften hat, ist es sehr wahrscheinlich, daß in der südamerikanischen Art ein solches asymmetrisches Hämoglobin $\alpha_2\beta_A\beta_B$ vorkommt.

Die Primär-Struktur von zwei der drei Ketten des südamerikanischen Lungenfisches β_A und α ist in Abb. 37,38 angegeben. Die β_A-Kette enthält 147 Aminosäuren, davon 12 His, 1 Met, 2 Trp und 2 Cys. Die α-Ketten sind aus 143 Resten aufgebaut und enthalten 11 His, 4 Met, 1 Trp und 3 Cys. Die β_A-Ketten sind um eine Aminosäure länger als die ß-Human. Sie sind ebenso lang wie alle bis heute bekannten Fisch-ß-Ketten (3,44) (Ausnahme: Hai (41) mit einer um 5 Aminosäuren kürzeren ß-Kette(45)). Merkwürdigerweise sind die α-Ketten um zwei Aminosäuren länger als die α-Ketten des Menschen und um eine Aminosäure länger als die α-Ketten aller sequenzierter Fisch-Globine (5,44,46). (Eine Ausnahme bilden die α-Globin-Ketten vom Hai (47), die 7 Aminosäuren mehr aufweisen als die α-Ketten des Menschen bzw. 6 Aminosäuren mehr als die der Fische). Ein anderes charakteristisches Merkmal der Fisch-α-Ketten fehlt bei α (LF). Alle bekannten Fisch-α-Ketten haben als N-terminale Aminosäure ein mit Acetyl blockiertes Serin (5,44,46,47,48,49), während die α-LF-Ketten mit einem freien Methionin beginnen. Freie N-terminale Aminosäuren haben sowohl die α-Ketten der Amphibien (Axoltol-Phe (50), Körnchenmolch-Met (51), spanischer Rippenmolch-Met (52)) (Abb. 39) als auch alle anderen α-Ketten der Säuger und Vögel.

Von den beiden ß-Ketten des Lungenfisches ist der N-Terminus einer Kette ($ß_B$) blockiert. Die andere ($ß_A$) beginnt mit Val. Die bis heute bekannten ß-Ketten der Fische(3,39,44,45,49,53,54) haben ebenso wie alle sequenzierten ß-Ketten von Vertebraten eine freie N-terminale Aminosäure. In dieser Hinsicht wäre der Lungenfisch eine Ausnahme. In der letzten Zeit wurde aber in unserer Abteilung bei der Bestimmung der Primär-Struktur der ß-Ketten zweier Krokodil-Arten ebenfalls ein blockiertes N-Terminus festgestellt. Außerdem entdeckte man auch eine Human-Hämoglobin-Variante, deren ß-Ketten am N-Terminus mit Acetyl blockiert ist, Hb Raleigh → Acetyl-Ala. HbA_1 und HbF_1 haben auch blockierte N-Termini (20 %).

Der ß1 Rest ist von Bedeutung für die physiologischen Eigenschaften des Hämoglobin-Moleküls von Säugern und Vögeln:

1) Er trägt zum CO_2-Transport als Carbamat und zum alkalischen Bohr-Effekt in Gegenwart der Phosphate bei.
2) Er ist eine Phosphat-Bindungsstelle für DPG im Human-Hämoglobin und IPP im Vogel-Hämoglobin. Durch Blockierung dieser Aminosäuren werden alle genannten Eigenschaften modifiziert (Ausführliche Diskussion siehe Kapitel IV.C.2.).

Ein homologer Vergleich der LF-Globin-Ketten mit den Human- (Abb.37) Karpfen- (Abb.38) und Amphibien-Globin-Ketten (Abb.39, 40) zeigt, daß mehr als 50% der Aminosäuren ausgetauscht sind (Tab. XIII).

Abb. 37 - Homologe Zuordnung der Ketten des Lungenfisches zu den Human-Ketten

10 20

H α Val - Leu Pro-Ala Lys-Thr-Asn-Val Ala Lys-Val-Gly-Ala-His-Ala-Gly-Glu-Tyr Ala

LF α Met-Arg-Phe-Ser-Gln-Asp-Asp-Glu-Val-Leu-Ile-Lys-Glu-Ala-Trp-Gly-Leu-Leu-His-Gln-Ile-Pro- -Asn-Ala-Gly-Gly-Glu-

LFß Val-His-Trp-Glu-Asp-Ala-Glu-Lys-Gln-Tyr-Ile-Val-Ser-Val-Phe-Ser-Lys-Ile Asp-Val-Asp-His-Val-Gly-Ala-Asn-

H ß Leu-Thr-Pro-Glu Ser-Ala-Val-Thr-Ala-Leu-Trp-Gly Val Asn Glu Gly-Glu-

10 20

30 40 50

Glu Leu-Ser-Phe Thr Thr Leu

Ala-Leu-Ala-Arg-Met-Phe-Ser-Asp/Cys-Tyr-Pro-Gly-Thr-Lys-Ser-Tyr-Phe-Pro-His-Phe-Gly-His-Asp-Phe-Ser-

Thr-Leu-Glu-Arg-Val-Leu-Ile-Val/Ala-Phe-Pro- -Thr-Lys-Arg-Tyr-Phe-Asn-Ser-Phe-Gly-Asp-Leu-Ser-Ser-Pro-Gly-Ala-Ile-

Ala Gly Leu Val-Val-Tyr Gln Phe Glu Thr Asp Val-

30 40 50

60 70 80

His-Gly-Ser-Ala-Gln Gly Ala Leu-Thr-Asn-Ala Ala Val-Asp Met-Pro-

Ala-Asn-Asn-Glu-Lys-Val-Lys-His-His-Gly-Lys-Lys-Val-Val-Asp-Ala-Ile-Gly-Gln-Gly-Val-Gln-His-Leu-His-Asp-Leu-Ser-

Lys-His-Asn-Asn-Lys-Val-Ser-Ala-His-Gly-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Ala-Ile-Ile-Glu-Cys-Thr-Arg-His-Phe-Gly-Asn-Ile-Lys-

Met-Gly- Pro Lys Lys Gly Phe-Ser-Asp-Gly-Leu-Ala Leu-Asp Leu

60 70 80

90 100

Asn-Ala Ser-Ala Asp-Leu His-Lys Arg Val Lys-Leu Ser-His-Cys-Leu-

Ser-Cys-Leu-His-Thr-Leu-Ser-Glu-Lys-His-Ala-Arg-Glu-Leu-Met-Val-Asp-Pro-Cys-Asn-Phe-Gln-Tyr-Leu-Ile-Glu-Ala-Ile-

Gly-His-Leu-Ala-Asn-Leu-Ser-His-Leu-His-Ser-Glu-Lys-Leu-His-Val-Asp-Pro-His-Asn-Phe-Arg-Val-Leu-Gly-Gln-Cys-Leu-

Thr-Phe Thr Glu Cys-Asp Glu Leu Asn-Val

90 100 110

Fortsetzung von Abb. 37:

```
    110                                                  120                                                  130
Leu-Val     Leu             Leu-Pro-Ala-Glu                  Ala-Val-His-Ala-Ser-Leu-Asp     Phe     Ala-Ser-Val-
Met-Thr-Thr-Ile-Ala-Ala-His-Tyr-Gly-Glu-Lys-   -Phe-Thr-Pro-Glu-Ile-Asn- ? -Ala-Ala-Glu-Lys- ? -Leu-Gly-Gln-Ile-
Arg-Ile-Glu-Leu-Ala-Ala-Ala-Leu-Gly-Phe-Lys-Glu-Phe-Thr-Pro-Glu-Arg-Asn-Ala-Tyr-Phe-Gln-Lys-Phe-Met-Asp-Val-Ile-
Val-Cys-Val         His-His-Phe                                  Pro-Val-Gln     Ala-Tyr         Val-Val-Ala-Gly-Val-
                                    120                                                  130

                        140
Ser-Thr         Thr     Lys
Val-His-Val-Leu-Ile-Ser-Leu-Tyr-Arg
Ser-His-Ser-Leu-Gly-Arg-Glu-Tyr-His
Ala-Asn-Ala     Ala-His-Lys
    140
```

In den Positionen α 2, 47, 48 und ß120 ist in den Human-Ketten je eine Deletion vorhanden.
In Position α 23 Lungenfisch ist eine Deletion vorhanden, die bei der numerierung nicht gezählt wurde.

Abb. 38 - Homologe Zuordnung der LF-Ketten zu den Karpfen-Ketten

In den Positionen α2 und α48 ist in der α-Kette des Karpfens je eine Deletion vorhanden.

```
                                                  10                                                  20
K  α Ac-Ser     Leu     Asp-Lys     Lys-Ala-Ala-Val     Ile         Ala-Lys-Ile-Ser-Pro-Lys-Ala-Asp-Asp-Ile     Ala
LF α   Met-Arg-Phe-Ser-Gln-Asp-Asp-Glu-Val-Leu-Ile-Lys-Glu-Ala-Trp-Gly-Leu-Leu-His-   -Gln-Ile-Pro-Asn-Ala-Gly-Gly-
LFß    Val-His-Trp-Glu-Asp-Ala-Glu-Lys-Gln-Tyr-Ile-Val-Ser-Val-Phe-Ser-Lys-Ile-   -   -Asp-Val-Asp-His-Val-Gly-Ala-
Kß A       Glu     Thr             Arg-Ser-Ala     Ile-Ala-Leu-Trp-Gly     Leu         Asn-Pro     Glu-Leu     Pro
                                                  10                                                  20

                30                                                  40                                  50
                Gly         Leu-Thr-Val         Gln         Thr         Ala     Trp-Ala         Leu     Pro
                                    Asp
Glu-Ala-Leu-Ala-Arg-Met-Phe-Ser-‡-Tyr-Pro-Gly-Thr-Lys-Ser-Tyr-Phe-Pro-His-Phe-Gly-His-Asp-Phe-Ser-Ala-Asn-
                                    Cys
Asn-Thr-Leu-Glu-Arg-Val-Leu-Ile-Val-Phe-Pro-Trp-Thr-Lys-Arg-Tyr-Phe-Asn-Ser-Phe-Gly-   -Asp-Leu-Ser-Ser-Pro-
                                    Ala

    Ala     Ala     Cys             Tyr             Gln     Phe     Ala     Tyr         Asn
                30                                      40                                          50

                                                    60                                          70
                Gly-Ser-Gly-Pro-        (Lys, His, Gly, Lys) Val-Ile-Met-Gly     Val     Asp-Ala     Ser-Lys-Ile-
                Asn-Asn-Glu-Lys-Val-Lys-His-His-Gly-Lys-Lys-Val-Val-Asp-Ala-Ile-Gly-Gln-Gly-Val-Gln-His-Leu-
Gly-Ala-Ile-Lys-His-Asn-Asn-Lys-Val-Ser-Ala-His-Gly-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Ala-Ile-Ile-Glu-Cys-Thr-Arg-His-Phe-
                Met-Gly     Pro         Ala                 Thr     Glu-Gly-Gly-Leu-Met-Arg-Ala-Ile-Lys-Asp-Met-
                                        60                              70

                80                                                  90                                  100
Asp             Val-Gly-Gly     Ala-Ser             Leu         Ser-Lys     Arg             Ala         Lys-Ile
His-Asp-Leu-Ser-Ser-Cys-Leu-His-Thr-Leu-Ser-Glu-Lys-His-Ala-Arg-Glu-Leu-Met-Val-Asp-Pro-Cys-Asn-Phe-Gln-Tyr-
Gly-Asn-Ile-Lys-Gly-His-Leu-Ala-Asn-Leu-Ser-His-Leu-His-Ser-Glu-Lys-Leu-His-Val-Asp-Pro-His-Asn-Phe-Arg-Val-
Asp             Ala-Thr-Tyr     Pro         Val-Met                                             Asp         Leu
    80                                      90                                              100
```

Fortsetzung von Abb. 38

```
                          110                                          120
    Ala-Asn-His     Val-Val-Gly    Met-Phe-Tyr-Leu-Pro-Gly-Asp          Pro         Val-His-Met-Ser-Val-Asp
Leu-Ile-Glu-Ala-Ile-Met-Thr-Thr-Ile-Ala-Ala-His-Tyr-Gly-Glu-Lys-    -Phe-Thr-Pro-Glu-Ile-Asn- ? -Ala-Ala-Glu-
Leu-Gly-Gln-Cys-Leu-Arg-Ile-Glu-Leu-Ala-Ala-Ala-Leu-Gly-Phe-Lys-Glu-Phe-Thr-Pro-Glu-Arg-Asn-Ala-Tyr-Phe-Gln-
    Ala-Asp     Ile-Thr-Val-Cys-Ala     Met-Lys-Phe     Pro-Ser-Gly     Ser     Asn-Val-Gln-Glu-Ala-Trp
                110                                     120                                  130

    130                                     140
    Phe-Phe-Gln-Asn-Leu-Ala-Leu-Ala        Ser-Glu-Lys
Lys- ? -Leu-Gly-Gln-Ile-Val-His-Val-Leu-Ile-Ser-Leu-Tyr-Arg
Lys-Phe-Met-Asp-Val-Ile-Ser-His-Ser-Leu-Gly-Arg-Glu-Tyr-His
        Leu-Ser     Val-Val-Asn-Ala      Lys      Gly
                          140
```

Abb. 39 - Homologe Zuordnung der α-Kette von LF zu den α-Ketten von Amphibien

```
                                        10                                      20
LF   Met-Arg-Phe-Ser-Gln-Asp-Asp-Glu-Val-Leu-Ile-Lys-Glu-Ala-Trp-Gly-Leu-Leu-His-Gln-Ile-Pro-Asn-Ala-Gly-Gly-
Ax   Phe-Lys-Leu     Gly-Glu     Lys-Ala-Asn-Val     Ala-Val     Asp-His-Val-Lys-Gly-His-Glu-Asp     Phe     His
Kö       Lys-Leu     Ala-Glu     Lys-His-Asn-Val     Thr-Thr     Asp-His-Ile-Lys-Gly-His-Glu-Glu     Leu     Ala

                30                                      40                                      50
     Glu-Ala-Leu-Leu-Arg-Met-Phe-Ser-Asp/Cys-Tyr-Pro-Gly-Thr-Lys-Ser-Tyr-Phe-Pro-His-Phe-Gly-His-Asp-Phe-Ser-Ala-Asn-
                Gly             Thr-Gly-Ile-Glu-Gln     His-Thr             Asp-Lys             Leu-Asn-Glu-Gly-
                Phe             Thr-Ser-Leu     Ala     Arg-Thr             Ala-Lys             Leu     Glu-Gly-

                        60                                      70                                      80
     Asn-Glu-Lys-Val-Lys-His-His-Gly-Lys-Lys-Val-Val-Asp-Ala-Ile-Gly-Gln-Gly-Val-Gln-His-Leu-His-Asp-Leu-Ser-Ser-
     Ser-Phe-Ala-Leu-His-Ser                     Met-Gly     Leu-Ser-Asn-Ala     Ala     Ile-Asp         Glu-Ala-
     Ser-Ser-Phe-Leu-His-Ser                     Met-Gly     Leu-Ser-Asn-Ala     Ala     Ile-Asp     Ile-Asp-Ala-

                                        90                                      100
     Cys-Leu-His-Thr-Leu-Ser-Glu-Lys-His-Ala-Arg-Glu-Leu-Met-Val-Asp-Pro-Cys-Asn-Phe-Gln-Tyr-Leu-Ile-Glu-Ala-Ile-
     Thr     Val-Lys         Asp             His-Asp                     Ala-Glu     Pro-Arg     Ala     Asp
     Ala     Cys-Lys         Asp             Gln-Asp                     Ala-Asn     Pro-Lys     Ala-His-Asn

             110                                     120                                     130
     Met-Thr-Thr-Ile-Ala-Ala-His-Tyr-Gly-Glu-Lys-Phe-Thr-Pro-Glu-Ile-Asn- ? -Ala-Ala-Glu-Lys- ? -Leu-Gly-Gln-Ile-
     Leu-Val-Val-Leu-Gly-Phe     Leu-Pro-Ala             Tyr-Ala-Val-Gln-Cys-Ser-Ile-Asp     Phe     His-Val-Thr-
     Leu-Val-Val-Met-Gly-Ile     Leu-Lys-Ala-His-Leu     Tyr-Pro-Val-His-Cys-Ser-Val-Asp     Phe     Asp-Val-Val-
```

Fortsetzung von Abb. 39

						140				
Val	His	Val	Leu	Ile	Ser	Leu	Tyr	Arg		
Met	Arg	Leu	Cys				Lys			
Gly					Thr		Lys			

Ax - Axolotl

Kö - Körnchenmolch

Abb. 40 - Homologe Zuordnung der $ß_A$-Kette vom Lungenfisch zu den ß-Ketten von Fröschen

```
                                                  10                                                  20
LF ßA  Val-His-Trp-Glu-Asp-Ala-Glu-Lys-Gln-Tyr-Ile-Val-Ser.Val-Phe-Ser-Lys-Ile-Asp-Val-Asp-His-Val-Gly-Ala-Asn-Thr-
R.c.ß                                 Gly-Ser-Asp     Val-Ser-Ala-Phe-Leu-Ala     Val     Lys-Arg-Ala         Gly-Glu-Ala
R.e.ß                                 Gly-Ser-Asp-Leu-Val-Ser-Gly-Phe-Trp-Gly     Val     Ala-His-Lys-Ile     Gly-Glu-Ala

          30                                                  40                                                  50
Leu-Glu-Arg-Val-Leu-Ile-Ala-Phe-Pro-Trp-Thr-Lys-Arg-Tyr-Phe-Asn-Ser-Phe-Gly-Asp-Leu-Ser-Ser-Pro-Gly-Ala-Ile-
    Ala     Leu     Ile-Val-Tyr             Gln             Ser-Thr         Asn     Gly     Ala-Asp
    Ala     Leu     Val-Val-Tyr             Gln             Thr-Thr         Asn     Gly     Ala-Asp

                        60                                                  70                                                  80
Lys-His-Asn-Asn-Lys-Val-Ser-Ala-His-Gly-Arg-Lys-Val-Leu-Ala-Ala-Ile-Ile-Glu-Cys-Thr-Arg-His-Phe-Gly-Asn-Ile-
Ser         Ser         Leu             Gln-Arg         Asp-Ser     Glu     Gly-Leu-Lys     Pro-Glx-Asx-Leu
Cys         Ala         Leu             Glu                         Gly     Gly-Leu-Lys     Pro-Glu     Leu

                                    90                                                  100
Lys-Gly-His-Leu-Ala-Asn-Leu-Ser-His-Leu-His-Ser-Glu-Lys-Leu-His-Val-Asp-Pro-His-Asn-Phe-Arg-Val-Leu-Gly-Gln-
    Ala-Tyr-Tyr     Lys         Glu-Arg         Gly-Glu                     Ala         Tyr-Arg         Asn
    Ala     Tyr     Lys         Glu-Tyr         Asn                         Ala             Leu         Asn

    110                                                 120                                                 130
Cys-Leu-Arg-Ile-Glu-Leu-Ala-Ala-Ala-Leu-Gly-Phe-Lys-Glu-Phe-Thr-Pro-Glu-Arg-Asn-   -Ala-Tyr-Phe-Gln-Lys-Phe-
Val     (Ile,Thr,Val)Met    Arg-His-Phe(His,Glx, -  Glx     Glx     Glx,Leu,Thr)(Cys,    Leu)(Cys,Ala,Val,Gly,
Val-Phe-Ile-Thr-Val         Arg-His-Phe-Gln-His -                       Leu-Gln-His     Leu-Glu-Ala-His
```

Fortsetzung von Abb. 40

```
                                140
Met-Asp-Val-Ile-Ser-His-Ser-Leu-Gly-Arg-Glu-Tyr-His
Glx,Ala,Leu)(His,     Ser,Phe)     Ala-Lys-Gly
Cys-Ala     Gly-Asp-Ala  —         Ala-Lys-Ala
```

R.c. - Rana catesbeiana (amerikanischer Ochsenforsch)
R.e. - Rana esculenta (eurpäischer Ochsenforsch)

Tab. XIII - Zahl der Austausche in den α und ß-Ketten von:

	ßH	$ß_A$K	$ß_A$K	ßRc.	ßRe.
$ß_A$LF	77(52%)	79(54%)	78(53%)	93(63%)	84(57%)
	H	K	Ax	Kö	
$α_{LF}$	84(59%)	92(64%)	92(64%)	89(62%)	

H - Human (4,10)
K - Karpfen (3,5)
R.c - Rana catesbeiana (amerikanischer Ochsenfrosch)
R.e - Rana esculenta (europäischer Ochsenfrosch)
Ax - Axolotl (50)
Kö - Körnchenmolch (51)

gegenüber der Ketten von LF. Die Lücken wurden wie Aminosäure Austausche bewertet.

Dieser erhebliche Unterschied zwischen den LF-Globin-Ketten und den anderen Ketten weist auf eine relativ große Distanz in der Phylogenie zwischen dem Lungenfisch und den anderen Spezies hin. Aus Tab. XIII ist deutlich zu ersehen, daß sich die Anzahl der Austausche nur geringfügig unterscheiden. Man könnte daraus schließen, daß der Lungenfisch in der Evolution genau soweit vom Menschen entfernt ist wie vom Karpfen oder von den Amphibien. Der Lungenfisch nimmt auch eine besondere Stellung im Stammbaum der Lebewesen ein (Abb.36).
In den Vorfahren des modernen Lungenfisches, den Dipnoern, könnte man"den seitlich abgezweigten Onkel der Amphibien vermuten. Es ist für die Wissenschaft ein Glück, daß die Lungenfische bis in moderne Zeiten auf verschiedenen Erdteilen überlebt haben, weil sie uns einen kleinen Schimmer geben von den wichtigen Wirbeltieren, die das verbindende Glied zwischen Fischen und landlebenden Wirbeltieren sind" (104).

Bei einer genaueren Betrachtung der Sequenzen der α- und $ß_A$ Ketten des Lungenfisches zeigte sich eine unregelmäßige Verteilung der Mutationen, die konservativen Bereiche jedoch blieben erhalten. In Vertebraten-Hämoglobinen können 7 Reste

als invariant bezeichnet werden: Gly B6, Thr C4, Phe CD1, His E7, Leu F4, His F8, Lys H10 und Tyr HC2 (57). Alle diese Reste sind auch im LF-Hb vorhanden. Von Wichtigkeit für die Funktion des Hämoglobins sind die zwei Kontaktbereiche zwischen den Untereinheiten, $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_1\beta_2$. In den Säugerhämoglobinen ruft die Oxygenierung erhebliche Änderungen an der $\alpha_1\beta_2$-Grenzfläche hervor, dagegen kaum Änderungen an den $\alpha_1\beta_1$-Bindungsstellen (15). Wenn man Tab. IX , X und XI betrachtet, kann man feststellen, daß mehr beteiligte Aminosäuren an den $\alpha_1\beta_1$-Kontakten (10 für α - und 8 für β_A-Ketten) ausgetauscht sind als an den $\alpha_1\beta_2$-Oberflächen (vier in α und zwei in β_A in der Oxy-Form, und vier in α und einer in β_A in der Deoxy-Form). Daß an den $\alpha_1\beta_2$ Bindungsstellen viel weniger Aminosäuren mutiert sind (besonders in den β_A-Ketten) weist auf die Wichtigkeit dieser Reste für die Erhaltung der physiologischen Eigenschaften des Hämoglobins hin.
Die Reste Trp (ßC3) und Tyr (C7) sind im LF-Hb vorhanden. Genau wie beim Karpfen (3) und Goldfisch ist der Cysteinrest ßF9 beim Lungenfisch durch Serin ersetzt. Die β_A-Kette enthält nur zwei Cysteine in E18 und G11. In den Human-ß-Ketten stehen an diesen Stellen zwei interne, unpolare Aminosäuren (58), nämlich Gly bzw. Val. Da in α -Human die Pos. G11 von einem internen, unpolaren Cysteinrest besetzt ist, könnte man annehmen, daß das ßCys G11(LF) auch eine interne Position einnimmt. Dadurch könnte diese Aminosäure den SH-Reagenzien unzugänglich werden.

Die Reste Asp αG1 und Asn ßG4 sowie auch Tyr αC7 sind vorhanden. Thr αC3 ist aber mit Gly ausgetauscht. Wahrscheinlich fallen beim Lungenfisch-Hämoglobin wie auch bei den anderen Fisch-Hämoglobinen einige Wechselwirkungen zwischen den ausgetauschten Aminosäuren aus und andere, neue werden gebildet.

His E7 und F8 wie auch Val E11 sind in den beiden Ketten des Lungenfisches vorhanden. In Position FG5 der α und $ß_A$-Lungenfisch-Ketten befindet sich Val, also genau wie beim Human-Hb. Die Position F7 ist in der α-Kette LF von Lys (anstelle des Leu im α-Human) und in der ß-Kette von Leu (genau wie in ß-Human) besetzt. Andere ausgetauschte Häm-Bindungsstellen sind in der Tab. XII aufgeführt. Wie ersichtlich, sind sehr wenige Aminosäuren mutiert: In der α-Kette zwei, in der $ß_A$-Kette drei. Von diesen sind nur in α F7 und ß C7 unpolare mit polaren Aminosäuren ausgetauscht.

Das Hämoglobin ist unempfindlich gegenüber Austauschen von Aminosäuren, die an der Oberfläche des Moleküls liegen (mit Ausnahme der Aminosäuren, die die Löslichkeit verändern). Es ist hingegen extrem empfindlich gegenüber den sogar sehr geringen stereochemischen Änderungen der internen, unpolaren Bindungsstellen, speziell jenen, die dem Häm nahe sind (59). Mutationen der α und ß Bindungsstellen beeinflussen die respiratorische Funktion, d.h., die O_2-Affinität, die Häm-Häm Wechselwirkung und das Gleichgewicht zwischen Tetrameren, Dimeren und Monomeren (59). Da beim Lungenfisch (wie auch bei allen anderen Tieren) die respiratorischen Bedürfnisse durch dessen Hämoglobin erfüllt sind, scheint es, als ob dieses Molekül entweder bei der Einführung der nicht isopolaren Austausche mit großen Konformations-Änderungen reagiert hat, um die neuen Ladungen zu konpensieren oder aber die meisten substituierten Aminosäuren selektiv neutral in der Evolution sind.

IV.C. Physiologie der Fisch-Hämoglobine

Die Sauerstofftransportfunktion des Blutes ist von verschiedenen Faktoren abhängig, von den allosterischen Cofaktoren, den Ionen, der Temperatur und von der Konzentration der gelösten Gase. Alle diese Faktoren wirken auf die Bindungseigenschaft des Hämoglobins ein. Die Empfindlichkeit des Hämoglobins gegenüber seinem Mikromedium ist durch die funktionellen Wechselwirkungen spezifischer Bindungsstellen ("sites") des Proteins bedingt. Diese Bindungsstellen kontrollieren und regulieren neben den aktiven Zentren (den Hämen) die Funktion des Hämoglobins; sie verursachen die Wechselwirkung zwischen Hb und Liganden. Man könnte sie in zwei Kategorien einteilen:

a) Die homotrope Wechselwirkung, also die Kooperativität der Häme, die sogenannte Häm-Häm Wechselwirkung. Die homotropen Effektoren (Liganden), O_2,CO ,NO etc. binden direkt an die aktiven Zentren (Häm). Die Bindung des ersten Liganden-Moleküls an das erste Häm des tetrameren Hbs erhöht die Affinität der anderen prosthetischen Gruppen.

b) Die heterotropen Effekte. Diese entstehen dadurch, daß die Bindung eines Effektors (H^+, organische Phosphate oder CO_2) an eine Bindungsstelle - nicht aber an das aktive Zentrum - die Reaktivität des aktiven Zentrums modifiziert.

Im Vergleich mit den Säugerhämoglobinen weist das Hämoglobin der Fische einige spezielle Unterschiede auf:

1) Der regulatorische Mechanismus des Fischblutes ist weniger entwickelt als der des Säugerblutes. Fische leben im Wasser, in dem der Sauerstoffdruck, die Temperatur und die Salzkonzentration sehr variieren. Ihre Hämoglobine müssen daher anpassungsfähiger sein als die der Säuger.

2) Die heterotropen Cofaktoren der Fischhämoglobine sind ATP und/oder GTP, auch IDP und IPP, wie kürzlich entdeckt wurde. Diese regulieren die Sauserstoffaffinität des Hämoglobins entsprechend dem variierenden Sauerstoffdruck.

3) Die Reaktion Phosphat-Hämoglobin in den Fischerythrocyten wird von Mg^{2+} beeinflußt. Dieses Kation bildet Komplexe mit ATP und GTP und modifiziert dadurch die Wirkung der Cofaktoren.

(Man muß aber berücksichtigen, daß der Metabolismus der Fischerythrocyten sehr groß ist und Mg^{2+} für die verschiedenen enzymatischen Reaktionen in der Zelle benötigt wird).

4) Im Gegensatz zu den Säugerhämoglobinen zeigen die Fischhämoglobine eine große elektrophoretische Heterogenität. Es gibt wenige Ausnahmen (vgl. Goldfisch).

5) Das Blut der Fische hat eine höhere Affinität gegenüber O_2 als das der Säuger. Bei vergleichbarem Partial-O_2-Druck ist dieses im Gegensatz zu dem der Säuger fast vollständig gesättigt. Dies könnte in Relation stehen mit den Schwierigkeiten der Atmung im Wasser. Hierbei sollte darauf hingewiesen werden, daß die Löslichkeit des O_2 mit der Erhöhung der Temperatur des Wassers sinkt. Dadurch kommen große Schwankungen der O_2-Konzentration im Wasser zustande, an die sich die respitatorische Funktion des Fischblutes anpassen muß. Eine hohe O_2-Affinität ist vorteilhaft für Fische, die im Wasser mit niedrigem pO_2 leben, während eine niedrige Affinität charakteristisch ist für aktive Fische, die in gut oxygeniertem Wasser leben. Für die erste Kategorie wäre die Aufnahme, für die zweite die Abgabe des Sauerstoffes von entscheidender Bedeutung. Der Bohr-Effekt erleichtert die Abgabe. Im allgemeinen wurde bei Fischen ein stärkerer Bohr-Effekt beobachtet als bei Säugern (d.h. die Fischhämoglobine sind empfindlicher gegenüber pH-Senkungen als die Säugerhämoglobine).

6) Die O_2-Affinität der Fischhämoglobine variiert sehr, sowohl zwischen verschiedenen Fischarten, als auch zwischen den Hämoglobin-Komponenten eines Fisches.

IV.C.1. Bohr- und Root-Effekt

Die Eigenschaften der Säugerhämoglobine bei der Ligandierung wurden durch das allosterische Modell erklärt (60). Nach diesem Modell kann das Hämoglobin in zwei verschiedenen Strukturen existieren. Die R-Form (oxy-Konformation) und die T-Form (deoxy-Konformation). Perutz (61) versuchte die homo- und heterotropen Effekte mit diesem Modell zu erklären. Die Sauerstoffbindung bei vielen Fischhämoglobinen kann in erster Annäherung durch eine niedrige Affinität (die T-Form) bei saurem pH und eine hohe Affinität (R-Form) bei alkalischem pH beschrieben werden. Wie bei Säugerhämoglobinen haben die meisten Hämoglobine der Fische eine O_2-Affinität, die mit der Erniedrigung des pH fällt bzw. mit der Erhöhung steigt. Während der Abgabe des Sauerstoffes wächst die H^+-Affinität, so daß Protonen aufgenommen werden. Die Erniedrigung der O_2-Affinität wird als Bohr-Effekt, die Protonen-Aufnahme als Haldane-Effekt bezeichnet. Die beiden Phänomene sind äquivalent und im allgemeinen unter dem Begriff alkalischen Bohr-Effekt zusammengefaßt. Der alkalische Bohr-Effekt macht das Hb zu einem (doppelten) respiratorischen Träger: Es nimmt die in der Reaktion des CO_2 mit H_2O frei werdenden Protonen auf und trägt damit zur Umsetzung des CO_2 zu löslichem Bicarbonat bei, das nun im Plasma vom Gewebe zur Lunge oder den Kiemen transportiert wird. Andererseits bindet das Hämoglobin Sauerstoff reversibel und transportiert ihn von dem respiratorischen Organ zum Gewebe. Im zweiten Fall erniedrigt der saure pH die Liganden-Affinität des Hbs. Der Sauerstoff wird leichter an die Gewebe abgegeben.

Der Bohr-Effekt wurde zuerst von Bohr, Krogh und Hasselbalch 1904 (62) als der Effekt des CO_2 auf der O_2-Gleichgewichtskurve des Hbs beschrieben. Bald stellte sich heraus, daß dieser Effekt eher auf die Kohlensäure als Protonen-Donor zurückzuführen ist (63), als auf das CO_2 selbst. Heutzutage wird der Bohr-Effekt als der Effekt des pH des Mediums auf die O_2-Affinität des Hbs bezeichnet. Er liefert den Zusammenhang zwischen dem O_2-Bindungsort (Häm) und den Protonenbindungsstellen, also den

Seitenketten der Aminosäuren. Der Bohr-Effekt ist die Folge einer Änderung der Quartär-Struktur des Hämoglobins während der Reoxygenierung (O_2-Abgabe). Perutz et.al. (17) haben die Reste identifiziert, die zum alkalischen Bohr-Effekt des Human-Hämoglobins unter den "in vivo" Bedingungen 0,1M NaCl und 2mM DPG wesentlich beitragen. Diese Reste sind Val NA1α , His H5α , Val NA1 ß, His NA2 ß (2ß), His H21ß,His HC3ß. Sie bilden Salzbrücken, die die T-Struktur des Hämoglobins stabilisieren. In Abwesenheit der Phosphate, aber in Gegenwart des 0,1M Cl^-, sind folgende Aminosäuren für den alkalischen Bohr-Effekt verantwortlich: Val NA1 α, His H5 α, Lys EF6ß und His HC3ß. (Lys EF6ß müßte demnach wichtig sein für die Hämoglobin-Species, deren O_2-Affinität nicht durch Phosphate reguliert werden).
Der alkalische Bohr-Effekt ist der einzige physiologisch wesentliche für die Vertebraten-Hämoglobine. Die Fisch-Hämoglobine zeigen einen zusätzlichen Effekt. Bei der Senkung des pH unter 6,2 sinkt bei diesen die O_2-Affinität bis auf einen so niedrigen Wert, daß das Hämoglobin nicht total gesättigt ist, auch wenn es mit Luft äquilibriert wird. Dieser Effekt könnte als ein extremer Bohr-Effekt bezeichnet werden und wurde nach Root, dem Entdecker dieses Phänomens (64) als: Root-Effekt bezeichnet. Beide Effekte sind für die Physiologie der Fische von besonderer Bedeutung: Der Bohr-Effekt sorgt für eine bessere Abgabe des Sauerstoffes. Der Root-Effekt wurde in Zusammenhang mit der Gasabgabe in die Schwimmblase gebracht (65). Noble et.al. (66) haben den Root-Effekt des Karpfen-Hämoglobins studiert. Sie fanden, daß bei pH 5,6 die Häm-Häm-Wechselwirkung des Hämoglobins verlorengegangen ist; die O_2-Affinität sinkt zwischen pH 8 und 5,6 um einen Faktor von 100. Nach Meinung der Autoren könnte der Root-Effekt auf struktureller Basis folgendermaßen erklärt werden: Das Karpfen-Hämoglobin kann bei saurem pH nicht von der T- zur R-Struktur übergehen, demzufolge bleibt es in der Deoxy-Form, der Struktur mit der niedrigeren Affinität gegenüber Sauerstoff. Eine zweite Hypothese beruht auf der Relation zwischen der Kooperativität und der Nonäquivalenz der α- und der ß-Ketten. Mit der Senkung des pH verstärkt sich die Nonäquivalenz zwischen den Untereinheiten mit

der Folge einer Abnahme der Kooperativität. Die Experimente liefern Daten, die beide Hypothesen unterstützen (67).
Diese extreme Änderung der O_2-Bindung unter pH 6,2 wurde bei sehr vielen Fischen beobachtet. Bei einigen, die mehrere Hb-Komponenten besitzen, wie z.B. die Forelle, und allen Fischen der Klasse II zeigt nur ein Teil der Komponenten den Bohr- und Root-Effekt (Hb III und IV Forelle), die anderen Komponenten sind pH-unabhängig (Hb I und II Forelle). Im Gegensatz dazu weisen alle drei Komponenten des Karpfens beide Effekte auf. Beim physiologischen pH bindet das Hb des Goldfisches den O_2 kooperativ, zeigt aber einen ausgeprägten Root-Effekt, der von Phosphaten beeinflußt wird (9). Diese heterotropen, allosterischen Effektoren vergrößern den pH-Wert bei dem sich der Bohr- und Root-Effekt bemerkbar machen sogar um eine Einheit (68).

Die Empfindlichkeit der Fisch-Hämoglobine gegenüber Protonen ist sehr unterschiedlich. Diese Unterschiede bestehen nicht nur zwischen den Hb-Komponenten eines Fisches, sondern auch zwischen Hämoglobinen solcher Fische, die unter ganz verschiedenen Bedingungen leben (z.B. Sumpfgewässer oder Quellwasser) oder unterschiedliche Atmungsmechanismen haben (Kiemen oder Lunge). Hierbei stellt sich auch das Problem des Überganges von der Wasser- zur Luftatmung. Studien über die CO_2-Empfindlichkeit der Knochenfischhämoglobine lassen vermuten, daß Fische, die Sumpfgewässer bewohnen, einen kleineren Bohr-Effekt zeigen als aktive Arten, die in gut belüfteten Gewässern leben. Diese haben ähnliche Hämoglobine, die sehr empfindlich schon gegenüber kleinen Änderungen des p CO_2 reagieren (vgl. Forelle und Makrele). Einen sehr kleinen oder gar keinen Bohr- und Root-Effekt zeigen Hämoglobine von Inger (der Inger hat monomere Hämoglobine) (69) und Hai (70).

Phelps et.al. (25) haben die respiratorischen Eigenschaften des Hämoglobins vom südamerikanischen Lungenfisch studiert und stellten folgendes fest:

a) Es ist ein normaler, alkalischer Bohr-Effekt vorhanden.
b) Der Bohr-Effekt ist sehr phosphatabhängig. So verursacht bei dem phosphatfreien Hämoglobin eine Zugabe von nur 1mM ATP eine starke Erhöhung des Bohr-Faktors von -0,18 auf -1,05. (Das Hämolysat hat einen Bohr-Faktor von -0,31). Bei Hämoglobinen des afrikanischen Lungenfisches wurden Bohr-Faktoren von -0,35 und -0,47 (Protopterus aethiopicus) (71,72) und -0,54 (Protopterus annectans) gemessen, bei dem des australischen Lungenfisches (Neoceradotus) ein Wert von -0,62 (72). (Die Wirkung der Phosphate auf die Hämoglobine der letzteren zwei Arten wurde nicht studiert). Die gefundenen Unterschiede sind nicht sehr groß, obwohl der Lebensraum dieser Fische ziemlich verschieden ist. Das Blut der drei Lungenfische zeigt keinen Root-Effekt (72,73,74).

Frühere Ergebnisse zeigten, daß die O_2-Affinität der Hämoglobine der luftatmenden Fische weniger empfindlich gegenüber Protonen (saurem pH) ist als die der mit Kiemen atmenden Fische (72,73,74,76,77,78,79). Diese Resultate unterstützen Carter's Hypothese (75), daß der Übergang von der Wasser- zur Landatmung mit der Abnahme der Wirkung des pH-Wertes auf die O_2-Affinität des Hämoglobins im Zusammenhang steht. Diese Hypothese wurde 1979 von Farmer et.al. (74) widerlegt. Während der Alpha Helix Expidition 1978 überprüften sie den Root-Effekt von 56 Fischarten aus dem Amazonasgebiet, und zwar von sowohl obligatorischen Luftatmern als auch von Fischen, die nur im Wasser atmen. Überraschenderweise fand man bei einigen Luftatmer-Hämoglobinen einen Root-Effekt. So weisen z.B. Arapaima gigas (Pirarucu) oder Hoplerythrinus unitaeniatus (fakultativer Luftatmer, Forellensalmler oder Paiche) einen starken Root-Effekt auf; Hoplosternum littorale (Schwielenwels) zeigt einen kleinen Effekt, der aber immerhin vorhanden ist (siehe Tab.I,S117-119 in (74). Wie schon erwähnt wurde, haben Lepidosiren (südamerikanischer Lungenfisch), Electrophorus (Zitteraal oder electrischer Aal) und Synbranchus (marmorierter Sumpfaal aus der

Familie der Kiemenschlitzaale) alle Luftatmer, keinen Root-Effekt. Die verschiedenen luftatmenden Fische atmen nach unterschiedlichen Methoden. Die Autoren konnten keinen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des Root-Effekts und der Atmungsart feststellen. Ebenfalls gibt es keinen Zusammenhang zwischen dem Root-Effekt und dem Vorhandensein einer oder multipler Hb-Komponenten. In den Fischen mit mehreren Hb-Komponenten sind nur einige davon pH empfindlich und zeigen einen Bohr- und einen Root-Effekt oder nur einen Bohr-Effekt. Daß der Root-Effekt nur bei einigen Hb-Komponenten vorkommt, könnte eine Strategie sein für die Anpassung dieser Fische an die sehr variablen Lebensbedingungen. Die strukturelle Basis beider Effekte, wie auch der molekulare Unterschied zwischen Ihnen, muß bei den Fisch-Hämoglobinen noch aufgeklärt werden. Perutz et.al. (17) haben die Aminosäurereste des Human-Hämoglobins, die für den alkalischen und sauren Bohr-Effekt verantwortlich sind, identifiziert. In Gegenwart von Cl^- und Phosphat in physiologischen Konzentrationen bilden diese Reste in der Deoxy, aber nicht in der Oxy-Form zusätzliche Salzbrücken, die die T-Struktur des Hämoglobins stabilisieren und zur Erniedrigung der O_2-Affinität durch Protonen führen. (Protonen erhöhen die Anzahl der Stickstoff-Atome, die positive Ladungen tragen). In Human HbA bilden sich folgende zusätzliche Ionenbindungen:

(einer Kette) Val NA1 ....X^-....Arg HC3 (der anderen Kette)
His HC3ß.....Asp FG1ß
Val NA1 .....Ser H14 (der selben Kette)

Die pKa-Werte der Val NA1ß, His NA2ß, His H21ß und Lys EF6ß werden im Deoxy-Hämoglobin durch die Wechselwirkung mit Phosphat erhöht. In den bereits sequenzierten Fisch-Ketten sind folgende Bohr-Gruppen vorhanden: Tab. XIV

Tabelle XIV - Bohr-Gruppen

Pos.in HbA / Tier	NA1 α	H5 α	NA1 ß	NA2 ß	H21 ß	HC3ß	HC3 α	FG1ß
H	Val	His	Val	His	His	His	Arg	Asp
K	Ac-Ser	His	Val	Glu	Arg	His	Arg	Glu
GF	Ac-Ser	His	Val	Glu	Arg	His	Arg	Glu
Sauger	Ac-Ser*	His*	Val**	Glu**	Arg	Kathod.: Tyr, Phe Anod.: His	Arg	---
Forelle I	Ac-Ser	His	Val	Glu	---	Phe	Arg	---
Forelle IV	Ac-Ser	---	Val	Asp	---	His	Arg	---
Hai I	Ac-Ser	His	Val	His	Lys	His	Arg	Glu
LF	Met	Asn	Val***	His	Arg	His	Arg	Glu

* Haupt-Kette

** Kathodische und Anodische ß-Ketten

*** 2ß-Ketten; eine hat den N-Terminus blockiert

Der Wert des Bohr-Effekts für Human-Hb wurde von Imai (80) bestimmt: -0,3 zwischen pH 6,8 und 8,8. Karpfen-Hb weist einen Bohr-Wert von $\Delta \log. P_{50}/\Delta pH \approx 0,7$ (ohne Cl^-) auf (81). Der Sauger hat 10 Hb-Komponenten, 8 anodische und zweit kathodische. Die anodischen Hämoglobine zeigen beide Effekte (leider gibt es keine Werte), die kathodischen sind pH-unempfindlich (54). Forellen-Hb I und II, die die kleinste anodische Mobilität zeigen, haben keinen Bohr-Effekt, während die O_2-Affinität des Hb IV (mit der größten anodischen Mobilität) bei Erniedrigung des pH (82) erheblich herabgesetzt wird. Der Bohr-Effekt des Hämoglobins IV ist viel größer als der des Human-Hämoglobins (siehe Kurve bei (82). Die Haupt-Komponente I des Hais hat keinen Bohr- und keinen

Root-Effekt. Der südamerikanische Lungenfisch zeigt einen mit dem des Human-Hämoglobins vergleichbaren Bohr-Effekt (-0,31) (25).

Aus den Werten der Tab. XIV könnten folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

1) Alle Hämoglobine, die keinen Bohr-Effekt zeigen, d.h. pH unempfindlich sind, haben:
   a) entweder mindestens drei mutierte Aminosäuren (Sauger kathodische Hämoglobine, Forelle I, Hai I)
   b) oder/und längere oder kürzere Ketten (Forelle I, Hai I) Die α-Ketten vom Hai enthalten 148, die ß-Ketten 141 Aminsäuren, α Forelle I 144 Aminosäuren. Bei diesen Hämoglobinen ist der N-Terminus von der α-Kette ausgetauscht und blockiert. Infolgedessen kann die Salzbrücke Val NA1 .....Arg HC3 nicht gebildet werden. Ebenso kommt die Ionenbindung His HC3ß.....Asp FG1ß nicht zustande, weil His durch Tyr oder Phe und Asp durch Glu ausgetauscht sind. Zusätzlich könnte die abnormale Länge der Ketten deren Tertiär- und Quartär-Struktur verändern.
2) Alle anderen Fisch-Hämoglobin-Komponenten zeigen einen größeren Bohr-Effekt als die des Human-Hämoglobins oder einen mit diesem vergleichbaren, obwohl auch in diesen Fisch-Hämoglobinen Austausche vorkommen, die die Bildung dieser Salzbrücken verhindern. Man könnte annehmen, daß in Fisch-Hämoglobinen andere, neue Aminosäuren für den Bohr-Effekt und die Protonen Aufnahme verantwortlich sind (83); die Fischhämoglobine wären dann eine Ausnahme.

IV.C.2. Kontrolle der O_2-Affinität der Fisch-Hämoglobine durch organische Phosphate

Die Bindung organischer Phosphate an Human-Hämoglobin wurde von Chanutin und Curnish (84) und Benesch und Benesch (85) 1967 entdeckt. Die Autoren demonstrierten, daß 2,3- DPG und ATP die O_2-Affinität des phosphatfreien Hämoglobins senken. Diese Rechtsverschiebung der O_2-Dissoziations-Kurve bedeutet "in vivo"

eine Erleichterung der Abgabe des Sauerstoffes durch Phosphate. Benesch et.al. (86) fanden, daß nur komplett deoxygeniertes Human-Hämolysat DPG binden kann. Das molare Verhältnis ist 1 Mol DPG per 1 Mol Hb. Die Reoxygenierung der Proben verursacht eine sofortige Abgabe des gebundenen DPG. Die Röntgen-Struktur-Analyse (15,18,87,88) zeigte die räumliche Anordnung des Phosphats im Hämoglobin-Molekül. Das Phosphat besetzt den Innenraum (die Tasche) zwischen den ß-Ketten des Deoxy-Hämoglobins und geht Wechselwirkungen ein mit der NH_2-Gruppe des Val NA1ß, der Seitenkette des His NA2ß, des Lys EF6 und des His H21. Insgesamt gibt es sieben Bindungsstellen. Drei in der Natur vorkommende Phosphat-Typen konnten als allosterische Effektoren experimentell nachgewiesen werden:

DPG - für Säuger
ATP,GTP - für Fische
IPP - für Vögel
DPG und IPP, daneben auch CO_2- für Reptilien und Amphibien

Die molekulare Basis für die unterschiedliche Selektion des allosterischen Effektors ist unbekannt. Da auf das Hb- Molekül verschiedene Phosphat-Typen die gleiche Wirkung haben, kann angenommen werden, daß der Mechanismus der allosterischen Wechselwirkung Phosphat-Hb in allen Vertebraten derselbe ist. Die Mannigfaltigkeit der Phosphate ist von einer großen Variabilität der Erythrocyten begleitet: Die roten Blutkörperchen der Fische, Reptilien, Amphibien und Vögel sind größer als die der Säugertiere und kernhaltig. Außerdem enthalten sie Mitochondrien, haben eine hohe Stoffwechselrate und können sich teilen. Die Erythrocyten der Säugertiere haben keinen Kern, keine Mitochondrien, zeigen keine Mitose und haben eine geringe Stoffwechselrate.

Die Verteilung und Funktion der organischen Phosphate innerhalb der Fischerythrocyten wurde kaum erforscht. ATP und GTP scheinen die predominanten Phosphate in den Erythrocyten der meisten Fische (8,9 und 89-96) zu sein. Sie wurden als allosterische Effektoren erkannt. Kürzlich entdeckten Isaacks et.al. (96,97) in den Erythrocyten des Luftatmers Arapaima gigas (Pirarucu) IPP (1,8uMol/mlRBC), in den Erythrocyten der echten Welse DPG

(1,9uMol/mlRBC) und (das erste Mal) IDP (1,3uMol/mlRBC) in den südamerikanischen Lungenfisch-Erythrocyten. Kleinere Mengen von IPP (0,36 und 0,24uMol/mlRBC) wurden von Borgese und Nagel (98) in zwei Knorpelfischen, im europäischen Hundsfisch und im Zitterrochen nachgewiesen. Die Konzentration des DPG in den Erythrocyten der echten Welse ist hoch genug um als Regulator der O_2-Affinität des Hämoglobins dieser Art zu fungieren. Sie überschreitet beträchtlich die notwendige Menge für die Glykolyse.
Das molare Verhältnis von IPP, DPG und IDP zum Hämoglobin des Pirarucu, der echten Welse und des Lungenfisches ist 0,41, 0,42, 0,45. Im Vergleich mit dem Verhältnis von GTP zu Hämoglobin in denselben Fischen 0,68; 0,39-0,074; 0,64-1,06 liegt es ziemlich hoch (DPG/Säuger Hb=1;IPP/Vögel 0,75-1) (99). Aus den bereits in der Literatur angegebenen Daten könnte für die luftatmenden Fische angenommen werden, daß die O_2-Affinität des gesamten Bluts durch eine Kombination der organischen Phosphate ATP+GTP, plus IDP,DPG oder IPP reguliert wird.
ATP war das erste organische Phosphat, das als allosterischer Effektor für Fischhämoglobine entdeckt wurde (90,100). GTP wurde allerdings dann als stärkster Effektor und in größeren Konzentrationen in den Fischerythrocyten nachgewiesen. Es ist der Haupt-Cofaktor der Karpfen-, Goldfisch-, Lungenfisch- und Aal-Hämoglobine. Isaaks et.al. (94) fanden in allen untersuchten Amazonas Fischhämoglobinen einen größeren Gehalt an GTP als an ATP. Das Verhältnis GTP/ATP ist verschieden von Art zu Art.

Eine Schwankung der Phosphat-Konzentration wird auch durch abnormale Lebensbedingungen (Hypoxie, Hyperoxie) hervorgerufen. Beim Karpfen (95) und Aal (100) verursachen hypoxische Bedingungen (PO_2 50mmHg) eine Erniedrigung des GTP bzw. ATP Gehalts in den Erythrocyten, während die O_2-Affinität erheblich steigt. Die phosphatfreien Hämoglobine des normoxischen und hypoxischen Karpfens haben dieselbe O_2-Affinität. In den fakultativ luftatmenden Fischen Hypostomus (Seemotte) und Pterygoplichtus (Schilderwels) beobachtete Weber et.al. (101,102) die gleichen Phänomene: Erhöhung der O_2-Affinität des Blutes und eine

Senkung des GTP-Gehalts. Solche Änderungen finden nicht im Synbranchus (Kiemenschlitzaal) statt, einem sowohl im Wasser als auch in der Luft atmenden Fisch. Wenn dieser Fisch aus dem Wasser herausgenommen wird, steigt sein Phosphat-Gehalt, wobei die O_2-Affinität sinkt.
Die Scholle (Pleuronectes platessa) (103), die normalerweise im hypoxischen Wasser lebt (30-60mmHg), wurde an den normalen (150mmHg) und hyperoxischen (300mmHg) O_2-Druck angepaßt; dadurch wurde eine reversible Kompensation induziert.
Die Ergebnisse waren überraschend. Die phosphatfreien Hämoglobine der hypoxischen und normoxischen Fische zeigen identische O_2-Affinitäten. Der ATP-Gehalt der Erythrocyten steigt von 1,06Mol/Mol Hb auf 1,77 in dem normoxischen Fisch und fällt auf 1,28Mol/Mol Hb in dem hyperoxischen Fisch. Entsprechend sinkt bzw. erhöht sich auch die O_2-Affinität des Bluts. Man könnte sagen, daß in der Scholle die Hyperoxie dieselbe Wirkung hat wie die Hypoxie. Im Gegensatz zu den genannten Fischen wirkt die Normoxie bei den Erythrocyten der Scholle genauso wie die Hypoxie bei denen der Säuger: Vergrößerung des Phosphat (bzw. ATP)-Gehalts, Verkleinerung der O_2-Affinität (Rechtsverschiebung der Dissoziationskurve) und schließlich eine Erhöhung der O_2-Abgabe an das Gewebe. Gleichzeitig wurde ein größerer Bohr-Effekt in den hypoxischen Fischen beobachtet. Alle diese Wirkungen der organischen Phosphate auf die O_2-Bindung werden durch die Wechselwirkung dieser Substanzen mit dem Hämoglobin hervorgerufen.

Die organischen Phosphate sind negativ geladen und bevorzugen, wie schon erwähnt, die Bindung an das Deoxy-Hb, in dem die N-terminalen Gruppen (der NA1) sowie auch die Seitenketten der Histidine (in Human-Hämoglobin NA2 und H21) und des Lys (EF6) der ß-Ketten in der ionisierten Form vorliegen. Daraus ergibt sich, daß in Gegenwart von Phosphaten das Deoxy-Hb protonisierter ist als in deren Abwesenheit. Dadurch wird die niederaffine Form (T-Konformation) stabilisert. Die N-terminale Aminosäure der bereits sequenzierten Fisch-ß-Ketten ist das freie Val, genau wie bei den Human-ß-Ketten: Diese Aminosäure

könnte eine Bindungsstelle für Phosphate sein. In Position NA2 ist beim Karpfen, Goldfisch, Sauger und bei der Forelle I His durch Glu ausgetauscht (Es tritt ein nicht isopolarer Austausch auf). Diese Phosphat-Bindungsstelle entfällt also für diese Kette. $ß_A$LF und ßHai haben His in der Position NA2. Lys EF6 ist bei allen Fischen vorhanden. His H21 ist beim ßHai durch Lys, beim Karpfen, Goldfisch, Sauger und Lungenfisch durch Arg ausgetauscht. Diese Aminosäuren könnten eine Bindungsstelle für Phosphate sein. Ihre Seitenketten sind ionisierbar und können Protonen aufnehmen. Es scheint, daß mit Ausnahme der Position NA2 alle anderen entsprechenden Aminosäuren der ß-Ketten in Wechselwirkung mit Phosphaten stehen können.

Organische Phosphate und deren Konzentrations-Schwankungen spielen eine große Rolle bei der Anpassung der O_2-Affinität des Fischbluts an die respitatorischen Bedingungen des Mediums. Ein allgemeiner Regulationsprozeß der O_2-Affinität kommt dann in der Natur vor, wenn Fische im Sauerstoffmangel leben oder leben müssen. Mit der Änderung des O_2-Drucks ändert sich sofort die Phosphat-Konzentration. Die totale Anpassung der Fische an solche neue Bedingungen ist aber erst nach einigen Tagen (z.B. nach 6 Tagen beim Karpfen) abgeschlossen. Das heißt, daß auch andere Kompensationsprozesse eingeschaltet sein müssen. Der größere Bohr-Effekt, der im Blut der hypoxischen Fische beobachtet wird, begünstigt eine leichtere Abgabe des O_2 in die Gewebe.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß über die Eigenschaften der Fischhämoglobine bisher keine ausreichenden experimentellen Daten vorliegen und deshalb über die Relation Struktur - Funktion - Anpassung nur Vermutungen angestellt werden können. Das Vorkommen multipler oder asymmetrischer Hämoglobine scheint in den Fischen die Regel zu sein. Noch sind die vorliegenden experimentellen Ergebnisse jedoch nicht ausreichend, um den Ursprung dieser Vielfältigkeit und die funktionellen Folgen zu erklären.

V. M E T H O D E N

V.1. Gewinnung der Hämoglobine des Goldfisches und des Lungenfisches

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung der Hämoglobine dienten 10-30 Goldfische von 8-20 cm Länge bzw. 10 Lungenfische von 50-60 cm Länge. Nach Betäubung der Fische in einer wässerigen Lösung von MS 222 (3-Aminobenzoesäureäthylester Methansulfonat 98 % von EGA-Chemie) wurden die Schwänze abgeschnitten, das Blut in gekühlte Heparinlösung getropft und die Erythrocyten abzentrifugiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte bei 10°C im wesentlichen nach Drabkin (105).
Die Erythrocyten vom Goldfisch wurden drei Mal mit 0,9% NaCl, die vom Lungenfisch mit 0,9% NaCl + 25 U.i. Heparin/ml gewaschen. Danach wurden sie 3 Stunden mit H_2O + 1% ß-Mercaptoäthanol + 5% CCl_4 hämolysiert. Nach Entfernung der Zellreste wurden die Hämoglobinlösungen der Häm-Abspaltung unterworfen.

V.2. Gehaltsbestimmung der Hämoglobinlösungen

Da die mit Cyanid ligandierte, 3-wertige Form des Hämeisens sowohl eine hohe Stabilität als auch ein relativ breites Absorptionsmaximum bei 540 nm aufweist, hat sich die Vermessung dieser Bande zur Gehaltsbestimmung von Hämoglobinlösungen durchgesetzt (106).
Zur Titerbestimmung wurden 50-100 µl Hämoglobinlösung mit Transormationslösung (0,16% $K_3Fe(CN)_6$ + 0,16% KCN in H_2O) auf 4 ml aufgefüllt. Nach 15 Min. wurde die Absorption der Probelösung gegen den Leerwert (Transformationslösung) bei 540 nm bestimmt (Zeiss Spektralphotometer PM6). Die Hämoglobinkonzentration läßt sich nach folgender Gleichung berechnen:

$$c_{Hb} = \frac{A_{540} \times F}{\varepsilon_{540} \times d}$$

c_{Hb} = molare Hämoglobinkonzentration
A_{540} = Absorption bei 540 nm $[- \lg T]$
ε_{540} = molarer Extinktionskoeffizient für Hämoglobin (empirisch) $[M^{-1} \times cm^{-1}]$
d = Schichtdicke der Küvette
F = Verdünnungsfaktor

Daraus läßt sich der Gehalt der Lösung in g/l errechnen.

$$C_{Hb} = c_{Hb} \times M_{Hb}$$

C_{Hb} = Hb in g/l
M_{Hb} = Molmasse des Hämoglobins

V.3. Häm-Abspaltung

Zur Abspaltung der prosthetischen Gruppe erwies sich die Methode von Rossi-Fanelli (107) als besonders geeignet. In salzsaurem Aceton bei -20°C wird das Häm abgespalten und das Globin fällt aus. Eine salzfreie 3-5%ige Hämoglobinlösung wurde in Eiswasser gekühlt. Eine Lösung von Aceton + 1% HCl wurde bis auf -20°C gebracht und konstant bei dieser Temperatur gehalten. Das Verhältnis Hämoglobinlösung : salzsaures Aceton muß 1 : 20 sein. Die Hämoglobinlösung wurde unter ständigem Rühren in die Acetonlösung eingetropft, wobei das Häm abgespalten wurde und das Globin ausfällt. Anschließend wurde der Niederschlag abzentrifugiert, zwei Mal mit Aceton + 1%HCl gewaschen, in 0,1 M Essigsäure gelöst, gegen dieselbe dialysiert und anschließend lyophilisiert.

V.4. Disk-Gel-Elektrophorese

Die Zahl der Hämoglobin-Komponenten vom Goldfisch sowie auch vom Lungenfisch konnte mit Hilfe der Disk-Elektrophorese (108) auf Polyacrylamidgelen in der apparativen Zusammenstellung der Fa. Shandon, Scientific Instr., London, bestimmt werden. Das Gel hatte eine Acrylamid-Konzentration von 10% und wurde aus folgenden Lösungen bereitet:

Lösung A: 36,3 g Tris
48 ml 1 N HCl
0,46 ml N,N,N,N-Tetramethylendiamin (Serva, Heidelberg) auf 100 ml mit H_2O bidest auffüllen, pH = 8,9

Lösung B: 25 g Acrylsäureamid (Serva, Feinbiochemica, Heidelberg)
0,4 g N,N-Methylenbisacrylsäureamid (Serva,Heidelberg)
auf 100 ml mit H_2O bidest auffüllen

Lösung C: 0,14 g Ammoniumperoxodisulfat (Merck)
auf 50 ml mit H_2O bidest auffüllen

Für einen analytischen Lauf in einer Elektrophoresekammer mit 12 Röhrchen wurden 2 ml Lsg. A, 6,4ml Lsg. B, 5,6ml bidest H_2O und 2ml Lsg. C in eine Saugflasche pipettiert und unter Rühren an der Wasserstrahlpumpe kurz entgast. Die Gellösung in den bis zu einheitlicher Höhe gefüllten Disk-Röhrchen wurde vorsichtig mit Wasser überschichtet. Nach der Polymerisation der Gele wurde das Wasser entfernt, die Gelröhrchen in den oberen Teil der Kammer eingesetzt (Kathodenraum) und der Anodenraum mit Elektrodenpuffer gefüllt. Die mit Saccharose versetzten und ligandierten Hämoglobinlösungen (20-40mg) wurden auf die Gele aufgetragen und vorsichtig mit Elektrodenpuffer überschichtet, dem eine Spur Bromphenolblau als Frontindikator zugesetzt war. Anschließend wurde der Katodenraum mit diesem Puffer aufgefüllt und die Kammer an ein Netzgerät angeschlossen. Zur Elektrophorese wurde folgender Puffer verwendet:

Elektrodenpuffer: 43,2 g Glycin
9,0 g Tris
auf 1 l mit H_2O bidest auffüllen, pH 8,3

Diese Stammlösung mußte 1 : 10 verdünnt werden.

Nach einer kurzen Zeit (15 Min.) des Konzentrierens mit 1 mA pro Röhrchen, lief die Elektrophorese 50-60 Min. mit 4,5 mA pro Röhrchen.
Die Gele wurden nach Ausspritzen aus den Glasröhrchen mit Glycerin-Wasser teils densitometrisch bei 415 nm mit einem Gilford Spektralphotometer 240, teils nach Fixieren und Färbung der Proteinbanden mit einer 1%igen Amidoschwarz - 10B - Lösung in 7%iger Essigsäure sowie anschließendem Auswaschen des überschüssigen Farbstoffes mit 7%iger Essigsäure ebenfalls densitometrisch bei 640 nm vermessen oder fotografiert.

V.5. Röhrchen-Gel-Elektrophorese im Harnstoff bei pH 3,5 nach (39).

Zur Bestimmung der Zahl der Globin-Ketten wurde eine unter denaturierenden Bedingungen im Harnstoff Elektrophorese durchgeführt, wobei eine Apparatur wie für die Disk-Gel-Elektrophorese beschrieben, verwendet wurde.
Das Gel hatte eine Acrylamid-Konzentration von 5% und wurde aus folgenden Lösungen bereitet:

Gelpuffer: 8 M Harnstoff (Merck) - 1000 ml
742 mg NaOH (0,018 M)
mit konz. Ameisensäure auf pH 3,5 eingestellt

Lösung A: 20 g Acrylsäureamid (Serva)
0,4 g N,N-Methylenbisacrylsäureamid (Serva)
mit Gelpuffer auf 100 ml

Lösung B: 50 ml 8 M Harnstoff (Merck)
50 ml Gelpuffer
1 g Ammoniumperoxodisulfat (Merck)

Lösung C: 50 ml 8 M Harnstoff (Merck) + 50 ml Gelpuffer
1 ml N,N,N,N-Tetramethylendiamin (Serva)

Elektrophoresepuffer: Gelpuffer 1 : 1 mit 8 M Harnstoff verdünnt

Für einen analytischen Lauf in einer Elektrophoresekammer mit 12 Röhrchen wurden 5 ml Lösung A und 5 ml Lösung C gemischt und entlüftet. Dann wurden 10 ml Lösung B zugegeben und die an einem Ende mit Parafilm verschlossenen Röhrchen bis zur selbstgeeichten Höhe von 6 cm gefüllt. Zur Erzeugung einer ebenen Ober-

fläche wurden die Gele mit etwas Wasser überschichtet. Nach zwei Stunden war die Polymerisation beendet. Nachdem der Elektrodenpuffer in beide Kammerhälften gefüllt war, wurden die mit 10 M Harnstoff, ß-Mercaptoäthanol und Saccharose versetzten Probelösungen durch Unterschichten auf die Geloberfläche aufgetragen. Die Elektrophorese dauerte 75 Min. und wurde mit 4,5 mA pro Röhrchen gefahren.
Die Gele wurden aus den Röhrchen ausgespritzt und mit 1% Amidoschwarz 10B in 7%iger Essigsäure gefärbt. Die Entfärbung erfolgte in 7%iger Essigsäure.

V.6. Platten-Gel-Elektrophorese

Die Plattentechnik (109,110) hat gegenüber der instrumentell einfacheren Röhrchen-Technik den Vorteil, daß gleichzeitig mehrere Proben im gleichen Gel analysiert werden können. Für die Zuordnung eng benachbarter Banden ist sie unerläßlich. Mit dieser Technik konnte das Hämoglobin des Goldfisches mit dem des Karpfens in einer Panta-Phor-Apparatur verglichen werden.
Das Gel hatte eine Acrylamid-Konzentration von 7,5%. Die Gel-Platte 12 x 16 x 0,3 cm wurde aus folgenden Lösungen hergestellt:

Puffer: 1 M Vorratslösung pH 8,9
605 g Tris
46 g Borsäure auf 5 l mit H_2O bidest auffüllen

Elektrophoresepuffer: 0,125 M : 300 ml Vorratslösung + 2100 ml H_2O

Lösung A: 10,65 g Acrylsäureamid (Serva)
250 mg N,N-Methylenbisacrylsäureamid (Serva)
auf 150 ml mit Elektrophoresepuffer

Die Polymerisation des Geles erfolgte, nachdem 145 ml Lösung A mit 50 mg Natriumsulfit (Merck), 0,1 ml TEMED und 2,8 ml 2% Ammoniumperoxodisulfatlösung in einer Saugflasche gemischt und für eine Minute entgast wurden. Dann wurde die Lösung luft-

blasenfrei in die vorbereitete Apparatur eingefüllt und sofort der Trogformer (Kamm) eingeschoben. Für 3 mm starke Gele sind 8-10 Tröge pro Gelplatte zu empfehlen. Nach 10-15 Min. begann die Polymerisation, die nach ca. einer Stunde beendet war. Für eine bessere Reproduzierbarkeit wurde die Polymersiation unter Kühlung bei ca. 10°C durchgeführt. Nach der Polymerisation stellte man die Apparatur senkrecht in eine Schale (Anodenraum) mit ca. 800 ml Elektrophorespuffer und füllte dann den oberen Teil (Kathodenraum) mit demselben Puffer. Die mit Saccharose und Bromphenolblau versetzten Proben (10-30 ul, 20-60 µg Hb) wurden mit einer Hamilton-Spritze in die Taschen appliziert. Die Elektrophorese dauerte bei 500 V (60 mA) 90 Min. und wurde bei 10°C durchgeführt.
Nach der Elektrophorese wurde die Gelplatte aus der Apparatur herausgenommen und in einer Schale mit Färbebad (0,01% Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva) in 0,6% Trichloressigsäure, 20% Methanol und 7% Essigsäure) über Nacht angefärbt. Die Entfärbung der Gelplatte erfolgte unter ständigem Schütteln in einer Lösung aus Methanol:Essigsäure:Wasser 6:1:14. Nach mehrmaligem Wechseln des Entfärbers konnte die Gelplatte ausgewertet und fotografiert werden.

V.7. Analytische Hochspannungselektrophorese auf Papier

50-60 µMol Spaltgemisch in 10-20 µl Elektrophoresepuffer pH 5,4 (50 ml Pyridin, 17,5 ml Eisessig mit bidest. H_2O auf 2,5 l) wurden strichförmig (2cm) auf Papier (Whatman, Chrom. Nr. 1) aufgetragen, das Papier mit Elektrophoresepuffer besprüht und blasenfrei auf die Elektrophoreseplatte aufgelegt. Die Elektrophorese wurde bei 3 kV (70-100 mA) 90 Min. unter Kühlung durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Papier bei Raumtemperatur getrocknet und mit 0,1% Ninhydrinlösung (1g Ninhydrin (Merck), 300 ml Eisessig, 40 ml Collidin, 700ml n-Butanol) besprüht. Bei 80°C wurde das besprühte Papier 15Min. getrocknet, wobei die gefärbten Peptidflecken sichtbar wurden.

V.8. Präparative Hochspannungselektrophorese auf Papier

Das Papier (Whatman Nr.1) wurde von Originalgröße 57 x 46 cm auf 57 x 36 cm zugeschnitten. Über die gesamte Breite wurde mit Bleistift in 20 cm Höhe eine Linie gezogen und diese 4 cm von den Seiten markiert. Die Probe (1 µMol) wurde portionsweise unter Trocknen strichförmig auf die Linie zwischen den Markierungen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde,wie unter der analytischen Hochspannungselektrophorese beschrieben, durchgeführt. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Papier getrocknet und von beiden Seiten ein 5 cm breiter Streifen abgeschnitten. Diese wurden mit 0,1% Ninhydrinlösung gefärbt, wieder ans Papier gelegt und so die Position der Peptide ermittelt. Die peptidhaltigen Bereiche wurden ausgeschnitten und die Peptide mit 2 N Essigsäure eluiert.

V.9. Carboxymethylierung des Globins bzw. der Ketten (111)

Für die weitere Verarbeitung wurden die Cystein-haltigen Ketten oder das Globin zum Schutz bzw. zur Blockierung der SH-Gruppen carboxymethyliert.
100 mg Protein in 8 ml entionisiertem Harnstoff mit 10 mg EDTA (Merck), 300 mg Tris (Merck) und 0,1 ml ß-Mercaptoäthanol (Merck) wurden mit 6N HCl auf pH 8,3 eingestellt. Über die Lösung wurde unter Rühren 5 Stunden bei Raumtemperatur Stickstoff geleitet. Danach wurde eine frisch bereitete Lösung von 100 mg (20facher Überschuß) Jodacetamid (Merck) in 1N NaOH zugegeben und der pH-Wert mit 6N HCl wieder auf 8,3 eingestellt. Die Reaktion lief eine halbe Stunde unter Lichtausschuß und Stickstoff-Überleitung. Mit 2 ml konzentrierter HCl wurde die Reaktion gestoppt. Die Entsalzung des carboxymethylierten Proteins erfolgte auf Sephadex G-25 (Pharmacia) in 1N Essigsäure.

V.10. Kettentrennung des Goldfischglobins (2)

200 mg natives Globin wurden in 8 M Harnstoff, pH 8,6 gelöst und zur Oxydation vier Stunden Luft durch die Lösung geleitet. Währenddessen fiel der pH-Wert von 8,6 auf 8,3-8,4. Anschliessend wurde die Probe angesäuert und auf eine Säule mit Sephadex G-100 (Pharmacia) 5 x 65 cm, die mit 50% Essigsäure äquilibriert war, aufgetragen. Die Elution erfolgte mit dem gleichen Lösungsmittel, die Durchflußrate war 17 ml/h. Die Fraktionen wurden bei 280 nm vermessen.
Man bekommt zwei ungleiche Gipfel. Der erste, größere besteht aus polymerisierten ß-Ketten, der zweite aus monomeren α-Ketten.

V.11. Kettentrennung des Lungenfischglobins

300 mg carboxymethyliertes Globin wurden in 10 ml 7M Harnstoff + 4% ß-Mercaptoäthanol gelöst und der pH-Wert auf 8,5 eingestellt. Danach wurde die Probe drei Stunden unter N_2-Überleitung gerührt und auf eine DEAE-Sephacel-Säule (2,5x10 cm), die mit 0,025 M Tris-HCl in 8 M Harnstoff und 1% ß-Mercaptoäthanol, pH 8,5, äquilibriert worden war, aufgetragen. Die Elution erfolgte zuerst mit dem äquilibrier Puffer (150 ml) und nachher mit einem linearen Gradienten aus 400 ml äquilibrier Puffer und 400 ml äquilibrier Puffer mit 0,2 M NaCl. Die Durchflußgeschwindigkeit war 27 ml/Stunde mit einem Fraktionsvolumen von 9ml/20 Min.
Die Auswertung der Säule wurde bei 280 nm durchgeführt. Die Gipfelfraktionen wurden vereinigt, gegen 0,1 M Essigsäure dialysiert und lyophilisiert. Durch Hand - Edman - Abbau wurde die Reinheit der Ketten geprüft.

V.12. Chemische Spaltungen

V.12.a. Saure Hydrolyse der Asp-Pro-Bindung (112) und Isolierung der Peptide

50 mg (3 µMol) Ketten wurden in 5 ml 6M Guanidin HCl in 70%iger Ameisensäure gelöst und 52-72 Stunden bei 42°C gespalten. Das gesamte Gemisch wurde auf eine Sephadex G-50 (fine) Säule (2,5 x 180 cm) aufgetragen. Äquilibrier- und Elutionsmittel war 8 M Harnstoff in 10%iger Ameisensäure. Die Elution erfolgte mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 18 ml/Stunde. Das Fraktionsvolumen betrug 4,5 ml. Die Fraktionen wurden bei 280 nm in einer automatischen Anordnung (Aschauer H.J., Dissertation, TU Wien 1978) diskontinuierlich vermessen. Die Gipfelfraktionen wurden vereinigt und auf einer Sephadex G-25 (medium) Säule (2,5 x 120 cm) in 1 N Essigsäure entsalzt und anschliessend lyophilisiert. Die Reinheit der Peptide wurde durch Aminosäureanalyse sowie durch Hand-Edman-Abbau geprüft.

V.12.b. Spaltung am Tryptophan mit o-Jodosobensoesäure (6) und Isolierung der Peptide

Die Spaltung der Ketten mit o-Jodosobensoesäure wurde nach vorheriger Carboxymethylierung der Cysteine durchgeführt.
50 mg (3 µMol) Ketten wurden in 4 ml 4M Guanidin/HCl (Merck) in 80%iger Essigsäure gelöst und mit 100 mg o-Jodosobensoesäure (Fa. Pierce Chemical Co., Rockford, Il, USA) umgesetzt. Nach 24 Stunden Reaktionszeit im Dunklen wurde die Probe über Sephadex G-25 medium in 1M Essigsäure entsalzt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden bis auf 1 ml am Rotationsverdampfer eingeengt und danach mit 3 ml Puffer (8M Harnstoff in 10%iger Ameisensäure) verdünnt und weiter chromatographiert. Die Trennung der Peptide erfolgte auf einer Sephadex G-50 fine Säule (2,5 x 180 cm) mit 8M Harnstoff in 10%iger Ameisensäure bei einer Durchflußrate von 15 ml/Stunde. Die Reinheit der Gipfel wurde nach dem Entsalzen durch Endgruppenbestimmung überprüft.

V.12.c. Spaltung mit BrCN (7) der Ketten und Isolierung der Peptide

Die Spaltung der Globinketten mit Bromcyan wurde nach vorheriger Reduktion der Methionine durchgeführt. Dazu wurden 170 mg (10 µMol) Ketten in 20 ml 6M Guanidin/HCl, pH 8 mit 4%igem ß-Mercaptoäthanol gelöst und 24 Stunden unter N_2-Überleitung reduziert. Nach dem Entsalzen über Sephadex G-25 medium in 0,1% NH_3 wurden die proteinhaltigen Fraktionen bis auf 20 ml eingeengt und die verbleibende Lösung 70%ig an Ameisensäure gemacht. Ein 40-facher, auf Methionin bezogener Überschuß an BrCN (190 mg) wurde zur Probe gegeben und unter Lichtausschluß fünf Stunden unter N_2 Überleitung reagieren gelassen. Das überschüssige BrCN sowie die Hauptmenge an Ameisensäure wurde nach Verdünnen mit Wasser am Rotationsverdampfer entfernt und die Probe lyophilisiert. Für die Trennung des Peptidgemisches wurde das Lyophilisat in 4 ml 8M Harnstoff, mit HCl auf pH 3,5 eingestellt, aufgenommen und auf eine Säule mit Sephadex G-50 fine (2,5 x 180 cm), die mit demselben Puffer äquilibriert worden war, aufgetragen und chromatographiert. Die Durchflußgeschwindigkeit war 10ml/Stunde. Die Gipfelfraktionen wurden nach dem Entsalzen lyophilisiert und durch Hand-Edman-Abbau auf ihre Reinheit geprüft.

V.13. Enzymatische Spaltungen

V.13.a. Tryptische Spaltungen (113) der α-Ketten des Goldfisches

Für die Spaltung der Goldfisch α -Ketten wurde TPCK-Trypsin (290 U/mg, 83% Protein) von der Fa. Worthington Bioch. Corp. verwendet. Dieses Enzympräparat zeigte die geringste chymotryptische Aktivität aller erhältlichen Präparate.
100 mg (6 µMol) Protein wurden in 8 ml Wasser suspendiert, mit 0,5 N NaOH auf pH 11 titriert und 2% TPCK-Trypsin (g/g) zugegeben. Da keine vollständige Lösung eintrat, wurden der Proteinlösung zusätzliche 2% Trypsin zugesetzt. Nach vier Stunden Spaltzeit bei R.T. unter Kontrolle des pH-Wertes wurde das Core

mit 0,5 N HCl bei pH 6,45 ausgefällt und abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde zwei Mal mit Wasser gewaschen, in Wasser mit NH_3 (pH 10,5) gelöst und lyophilisiert. Die vereinigten Überstände mit den im Sauren löslichen Peptiden wurden auf 8 ml eingeengt, mit 0,5 N HCl auf pH 3 titriert und durch Chromatographie auf Sephadex G 25 vorgetrennt.
Säule: Sephadex G 25 (fine) (2,5 x 130 cm)
Äquilibrier- und Elutionsmittel: 0,1 M Essigsäure
Durchflußgeschwindigkeit: 16 ml/h
Fraktionsvolumen: 5,3 ml/20 Min.
Die Fraktionen wurden bei 280 nm und 230 nm vermessen. Die Auswertung der einzelnen Gipfel erfolgte durch Hochspannungspapierelektrophorese.
Die Gipfel, die mehr als ein Peptid enthielten, wurden über Dowex 50 x 4 (200-400 meth) (Roth, Karlsruhe) rechromatographiert. Die Bedingungen sind in Tab. XV wieder gegeben.

V.13.b. Tryptische Nachspaltung des N-terminalen Peptids (Pos.1-99) aus der Asp-Pro-Spaltung der ß-Ketten des Goldfisches

100 mg (8 µMol) ß-Peptid wurden in 8 ml Wasser pH 10,5 gelöst und mit 2% TPCK-Trypsin (g/g) umgesetzt. Nach vierstündiger Reaktion bei R.T. unter Kontrolle des pH-Wertes wurde das Spaltgemisch direkt über Sephadex G 25 chromatographiert.
Säule: Sephadex G-25 fine (2,5 x 130 cm)
Äquilibrier- und Elutionspuffer: 0,01 M NH_4HCO_3, pH 9,5
Durchflußgeschwindigkeit: 15 ml/h
Fraktionsvolumen: 5 ml/20 Min.
Die Fraktionen wurden bei 280 und 230 nm vermessen. Die vereinigten Fraktionen wurden lyophilisiert. Die Auswertung der Gipfel erfolgte durch Hochspannungselektrophorese bei pH 5,4. Die Gipfel, die mehrere Peptide enthielten, wurden über Dowex 50Wx4 rechromatographiert. In Tab. XVI werden die Bedingungen wiedergegeben.

Tabelle XV - Isolierung der tryptischen α-Peptide vom Goldfisch durch Ionenaustauscherchromatographie

Tryptische Fraktionen*	Peptidgemisch**	DOWEX 50Wx4 Temperatur Säule Durchflußrate	Puffersystem und Gradienten
B 3	Tp 1 (a+b)(Pos.1-7) Tp4b (Pos.21-31) Tp9a (Pos.62-73)	42°C 0,6 x 55 cm 22 ml/h	Äquilibrierpuffer: 0,2MPyridin-Acetat pH 2,98 Gradient: logarithmisch 300 ml Äquilibrierpuffer, 300 ml 0,6 M Pyridin-Acetat pH 3,7
B 4	Tp5 (Pos.32-40) unbestimmtes Gemisch	42°C 0,6 x 25 cm 16 ml/h	Äquilibrierpuffer: 0,2M Pyridin-Acetat pH2,88 Gradient: linear 250ml Äquilibrierpuffer 250 ml 0,6 M Pyridin-Acetat pH 3,8
B 5	Tp2 (Pos. 8-11) Tp4a (Pos.17-20) Tp6 (Pos.41-57) Tp7 (Pos.58-60) Tp11 (Pos.94-100)	42°C 0,6 x 45 cm 13 ml/h	Äquilibrierpuffer: 0,6M Pyridin-Acetat pH3,5 Gradient: logarithmisch 250 ml Äquilibrierpuffer, 250 ml 2 M Pyridin-Acetat pH 6
B 6 + 7	Tp3 (Pos. 12-16) Tp10 (Pos. 92-93) freies Lys (Pos61)	42°C 0,6 x 45 cm 15 ml/h	Äquilibrierpuffer: 0,6M Pyridin-Acetat pH3,83 Gradient: linear 200 ml Äquilibrierpuffer 200 ml 2 M Pyridin-Acetat pH 6
α- Core	Tp11	42°C 0,6 x 50 cm 12 ml/h	Äquilibrierpuffer: 0,2M Pyridin-Acetat pH2,88 Gradient: linear 350 ml Äquilibrierpuffer 350 ml 2 M Pyridin-Acetat pH 6

* Die Numerierung der tryptischen Frakt. erfolgte nach der Reihenfolge der Elution bei der Vortrennung.

** Die Numerierung der Peptide ergab sich aus der homologen Zuordnung zu den β-Ketten.

Tabelle XVI - Isolierung der tryptischen ß-Peptide vom Goldfisch durch Ionenaustauscherchromatographie

Tryptische Fraktionen*	Peptidgemisch**	DOWEX 50Wx4 Temperatur Säule Durchflußrate	Puffersystem und Gradienten
B 4	Tp8+9a (Pos.66-73) Tp9c (Pos.77-82)	42°C 0,6 x 25 cm 13 ml/h	Äquilibrierpuffer:0,2M Pyridin-Acetat pH3 Gradient: logarithmisch 200ml Äquilibrierpuffer, 200 ml 0,6M Pyridin-Acetat pH 3,8
B 5	Tp9b (Pos.74-76) Tp9c (Pos.77-82) Tp11a (Pos.96-99)	42°C 0,6 x 40 cm 13 ml/h	Äquilibrierpuffer: 0,2M Pyridin-Acetat pH2,86 1.Gradient: logarithmisch,250 ml Äquilibrierpuffer, 250 ml 0,6M Pyridin-Acetat pH 3,8 2. Gradient: linear,Puffer im Mischgefäß 250 ml 2 M Pyridin-Acetat pH 6

* Die Numerierung der tryptischen Frakt. erfolgte nach der Reihenfolge der Elution bei der Vortrennung.

** Die Numerierung der Peptide ergab sich aus der homologen Zuordnung zu den α-Ketten.

V.13.c. Tryptische Spaltung der α-Ketten des Lungenfisches und Isolierung der Peptide

Die tryptische Spaltung der α-Ketten vom Lungenfisch erfolgte im wesentlichen wie bei Punkt V.13.a.
Die Unterschiede waren folgende:

a) Die α-Ketten vom Lungenfisch waren nach der tryptischen Spaltung bei pH 11 nicht vollständig gelöst. Das ungespaltene Material wurde abzentrifugiert.
b) Es gab zwei Core-Ausfällungen: Eine bei pH 6 (Core I) und eine zweite bei pH 3,35 (Core II). Core I war eine Peptidmischung, während sich Core II als sauberes Peptid erwies.

Die im Sauren löslichen Peptide wurden auf einer Säule mit Sephadex G-25 (2,5x142 cm) in 0,1 M Essigsäure und einer Durchflußgeschwindigkeit von 15 ml/Stunde vorgetrennt. Der Peptidgehalt der einzelnen Gipfel wurde durch analytische Papierchromatographie und Analyse festgestellt. Die tryptische Fraktion VII enthielt die fehlenden Peptide Tp5 (Pos.32-40) und Tp9b (Pos.89-91), die durch Rechromatographie auf Dowex 50Wx4 gewonnen wurden. Nach der Elution der anderen im Gemisch enthaltenen Peptide wurde das Peptid Tp9b mit 50%iger Ameisensäure isoliert. Die Gipfel I und II enthielten ein Gemisch der Peptide Tp9a (Pos.64-88) und Tp8+9a (Pos.63-88). Eine weitere Trennung dieser Peptide war nicht notwendig.

V.13.d. Tryptische Spaltung der β_A-Ketten des Lungenfisches und Isolierung der Peptide

Die Bedingungen dieses Verfahrens waren die gleichen wie bei Punkt V.13.c. Da die ß-Ketten im Alkalischen unlöslich sind, erfolgte die Spaltung in Suspension. Nach der vierstündigen Spaltung bei Zimmertemperatur wurde das ungespaltene Material abzentrifugiert und die nunmehr klare Lösung bis auf pH 3,2 titriert. Es gab keine Core-Ausfällung, weder bei pH 6, noch bei pH 3,2. Anschließend erfolgte die Vortrennung der Peptide auf Sephadex G-25 fine (2,5x120 cm) in 0,1M Essigsäure. Durch-

flußrate: 13,5 ml/h. Fraktionsvolumen: 4,5 ml/20Min. Der Peptidgehalt der Gipfel wurde durch analytische Papierelektrophorese überprüft. Zur weiteren Isolierung der Peptide wurden die Gipfel auf Dowex 50Wx4 rechromatographiert. Die Bedingungen dieser Versuche sind in Tabelle XVII wiedergegeben.

V.13.e. Tryptische Nachspaltung des oxidierten α-Cores des Goldfisches zur Gewinnung des Peptids α Tp11

Das Peptid α Tp11 ist schwer löslich und fällt nach der tryptischen Spaltung der α-Ketten mit dem Core aus. Um das Peptid zu gewinnen, wurde eine tryptische Nachspaltung des oxidierten α-Cores durchgeführt.
12 mg oxidiertes α-Core wurden in 2 ml Wasser suspendiert und mit 0,5 N NaOH auf 10,5 titriert, wobei sich das gesamte Material löste. Die Probe wurde mit 0,3 mg TPCK-Trypsin versetzt und vier Stunden bei R.T. unter Kontrolle des pH-Wertes gespalten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 N HCl (pH2) gestoppt. Das Peptid α Tp11 wurde durch Chromatographie auf Dowex 50Wx4 isoliert. Die Chromatographie-Bedingungen sind in Tabelle XV wiedergegeben.

V.13.f. Spaltung des αTp1(a+b) des Goldfisches mit Chymotrypsin und Isolierung der Peptide

1,8 µMol α Tp1(a+b) wurden in 0,5 ml 0,1M NH_4HCO_3 pH 8,6 gelöst und mit 3 mg Chymotrypsin (50,9 U/mg, Fa.Worthington Biochem. Corp.) 48 Stunden bei 37°C nachgespalten. Anschließend wurde die Probe mit 0,5 N HCl auf pH 2,3 titriert und zur Isolierung der Peptide auf eine Dowex 50Wx2 Säule (0,6x20 cm) aufgetragen, die zuvor mit 0,1M Ameisensäure pH 2,33 äquilibriert worden war. Die Chromatographie wurde bei 42°C und mit einer Durchflußrate von 12 ml/h durchgeführt. Bei Elution mit Äquilibrierpuffer erschien das N-terminale Dipeptid mit der Front. Das am Harz absorbierte, chymotryptische Pentapeptid wurde mit 2M Pyridin-

Tabelle XVII - Isolierung der tryptischen ß-Peptide vom Lungenfisch durch Austauschchromatographie

Tryptische Fraktion	Peptidgemisch	DOWEX 50Wx4 Temperatur Säule Durchflußrate	Puffersystem und Gradienten
IV	Tp3 (Pos.18-30) kleine Menge Tp8+Tp9a (Pos66-76) Tp10 (Pos 83-95) kleine Menge	42°C 0,6 x 28 cm 15 ml/h	Äquilibrierpuffer: 0,2M Pyridin-Acetat pH2,85 Gradient: linear 300 ml Äquilibrierpuffer 300 ml 2M Pyridin-Acetat pH 6,21
V	Tp3 (Pos 18-30) Haupt.Menge Tp10 (Pos 83-95) Haupt.Menge Tp9a+Tp12b(Pos67-76) (Pos 112-120)	42°C 0,6 x 28 cm 15 ml/h	Wie bei T-IV
VII	Tp5a (Pos 41-55) kleine Menge Tp5b+Tp6+7 (Pos 56-59, 60-65) Tp11 (Pos 96-104) Tp12a (Pos 105-111) Tp14 (Pos 134-144)	42°C 0,6 x 50 cm 15 ml/h	Äquilibrierpuffer: 0,2M Pyridin-Acetat pH2,85 1.Gradient: logarithmisch 300 ml Äquilibrierpuffer, 300 ml 0,6M Pyridin-Acetat pH3,62 2.Gradient: linear 300 ml Puffer im Mischgefäß 300 ml 2 M Pyridin-Acetat pH 6,12
VIII	Tp1 (Pos 1- 8) Tp2 (Pos 9-17) Tp5a(Pos 41-55) Hauptmenge Tp5b+Tp 6+7 (Pos 56-59,60-65) Tp9b (Pos 77-82) Tp12a (Pos 105-111) Tp13a (Pos 122-127)	42°C 0,6 x 52 cm 15 ml/h	Wie bei T-VII

Acetat-Puffer pH 6 eluiert. Die Fraktionen wurden nach alkalischer Hydrolyse und Ninhydrinreaktion am Technicon vermessen.

V.14. Auswertung der Trennungen

Die Eluate wurden mit einem Fraktionssammler der Firma Isco Instrumentation Co., Lincoln, Nebraska, in Fraktionen mit konstantem Volumen gesammelt. Die Trennsäulen wurden mit einer LKB 12000 Varioperpex Perestaltic Pump eluiert. Die Auswertung der Eluate wurde entweder durch diskontinuierliche Vermessung bei verschiedenen Wellenlängen oder durch Ninhydrinreaktion im Technicon durchgeführt.

V.15. Diskontinuierliche Absorptionsmessungen

Die Messungen wurden mit einer automatischen "OFF-line"-Apparatur (H.J.Aschauer, Dissertation, TU Wien, 1978) durchgeführt. Die Absorbtionsmessungen der einzelnen Fraktionen waren von 0,1 - 2,0 A und wurden mit einem Zweistrahlspektralphotometer gemacht. Die Apparatur erlaubte die Rückführung des Probenmeßvolumens und die Messungen bei beliebiger Wellenlänge.

V.16. Automatische Messungen durch Ninhydrinreaktion im Technicon

Die Messungen wurden mit dem Technicon Autoanalyser für alkalische Hydrolyse der Fa. Technicon durchgeführt.
Folgende Reagenzien wurden verwendet:

Probenpuffer:	1:10 verdünnter 5M Pyridin-Äthylmorpholin-Puffer pH 10
Neutralisiergemisch:	40% Essigsäure mit 18% 5M Natriumacetat-Puffer
Ninhydrinreagenz:	2% Ninhydrin und 0,15% Hydrindantin in Cellosolve:5M Natriumacetat-Puffer pH 5,5 3:1

Mittels eines Probennehmers wurde ein Aliquot von 50 µl Probe sowie 300 µl Probenpuffer entnommen und bei 95°C 20 Min. einer alkalischen Hydrolyse mit 2,5 N NaOH unterworfen. Nach der Neutralisierung der hydrolysierten Probe mit Neutralisiergemisch wurde diese mit Ninhydrinreagenz versetzt. Während der Reaktionszeit von 15 Min. entwickelte sich eine blaue Farbe, die bei 570 nm kolorimetrisch vermessen wurde.

V.17. Entsalzung peptidhaltiger Fraktionen

Harnstoff und Guanidin müssen aus den Proben entfernt werden, da sie eine Aminosäureanalyse oder eine Sequenzbestimmung unmöglich machen. Es wurde eine Sephadex G-25 Säule (2,5x100 cm) verwendet, die mit 1M Essigsäure oder 0,1% NH_3 äquilibriert war. Die Peptide wurden mit einer maximalen Durchflußgeschwindigkeit von 100 ml/h eluiert. Die Gipfelfraktionen wurden vereinigt, mehrmals einrotiert und lyophilisiert.

V.18. Leitfähigkeitsmessungen

Der Verlauf eines Salzgradienten kann durch die Messung der Leitfähigkeit der einzelnen Fraktionen bestimmt werden. Die Leitfähigkeitsmessungen wurden mit einem Leitfähigkeitsmeter (Leitfähigkeitsmeter für Laborzwecke PW 9501/01, Philips, Eindhoven, Holland) in Verbindung mit einer Leitfähigkeitsmeßzelle (PW 9513) durchgeführt.

V.19. Aminosäureanalyse

Ca. 50-100 nmol Peptid bzw. Protein wurden mit 1ml 6N HCl (Merck, HCl suprapur) 20 Stunden bei 110°C hydrolysiert. Anschließend wurde die HCl im Vakuum am Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand in 0,2M Natriumcitratpuffer pH 2,2 aufgenommen. Die Analyse erfolgte nach dem Zweisäulenverfahren (114) auf

einem Gerät Modell 121c Palo Alto, Kalif., USA, der Firma Beckman. Die Werte von Threonin und Serin mußten korrigiert werden. Die Auswertung der Analysen erfolgte mit einem Minicomputer (Digital PDP-8/E, Digital Equipment Corp., Maynard, Mass., USA), das an den Analysator gekoppelt war.

V.20. Tryptophan-Bestimmung durch Aminosäureanalyse

Die saure Hydrolyse zerstört die Tryptophanreste vollkommen. Ein Zusatz von Thioglykolsäure zur 6N HCl hat einen Schutzeffekt gegenüber Trp. (115).
50-100 nmol Peptid bzw. Protein wurden in 1 ml 6N HCl mit 60ul Thioglykolsäure (Merck) 20 Stunden bei 110°C hydrolysiert. Anschließend wurde die HCl im Vakuum abgedampft, der Rückstand in 0,2M Natriumcitratpuffer pH 2,2 aufgenommen und im Analysator mit der kurzen Säule für die basischen Aminosäuren bestimmt.

V.21. Bestimmung von Cystein und Methionin durch Aminosäureanalyse (116)

Cystein und Methionin können nicht durch saure Hydrolyse bestimmt werden, da sie nicht stabil sind. Für die Bestimmung dieser Aminosäuren muß Cystein in den Ketten zu Cysteinsäure und Methionin zur Methioninsulfon oxidiert werden. In dieser Form können sie durch saure Hydrolyse bestimmt werden.
Die Oxidation erfolgt mit Perameisensäure. 1,8 ml konzentrierte Ameisensäure (Merck) werden in einem verschlossenen Glas mit 0,2 ml Perhydrol 30% (Merck) für eine Stunde bei Raumtemperatur umgesetzt. Dabei wird die Ameisensäure zur Perameisensäure oxidiert. Anschließend erfolgt die Reaktion nach Zugabe von 1-2 mg Protein im Eisbad. Nach 3 Stunden wird die Lösung mit Wasser verdünnt und durch mehrmaliges Einengen am Rotationsverdampfer die Perameisensäure entfernt. Das oxidierte Protein wird lyophilisiert und weiter,wie für die Aminosäureanalyse beschrieben, aufgearbeitet.

V.22. Manuelle Endgruppenstimmung (117-119)

Die N-terminale Aminosäuresequenzanalyse wurde nach der Phenylisothiocyanat-Methode durchgeführt.
0,1-1,0 µMol Peptid in 0,4M Dimethylallylamin in 60%igem Propanol (mit Trifluoressigsäure auf pH 9,5 gebracht) wurden mit 50 µl Phenylisothiocyanat versetzt, 5 Min. N_2 übergeleitet und im Wasserbad bei 50°C 30Min. inkubiert. Zur Entfernung von Puffer und überschüssigem Reagenz wurde nacheinander mit je 1ml Essigester:Heptan 1:10 und 1:2 sowie Essigester gewaschen. Die wässrige Phase wurde einrotiert und der Rückstand (Phenylthioncarbamylderivat PTC-Derivat) nochmals mit Essigester gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Die zyklisierende Spaltung des PTC-Derivates erfolgte mit 100 µl Trifluoressigsäure 15 Min. bei 40°C. Nach Abdampfen der Trifluoressigsäure wurde das Thiazolinonderivat drei Mal mit je 1 ml Äthylenchlorid extrahiert. Der Rückstand wurde im N_2-Strom trockengeblasen und für weitere Abbauschritte verwendet.
Die Äthylenchlorideluate wurden im N_2-Strom getrocknet und mit 200 ul 1N HCl 10 Min. bei 80°C konvertiert. Das so entstandene Phenylthiohydantoinderivat (PTH-Derivat) wurde drei Mal mit je 1 ml Essigester extrahiert, die Essigesterphasen vereinigt und im N_2-Strom eingedunstet. Der Rückstand wurde in 20 ul Äthylenchlorid aufgenommen und die PTH-Aminosäure identifiziert.

V.23. Automatische Sequenzierung (118)

Der schrittweise Abbau der Aminosäuren erfolgte in einem Beckman Sequencer 890B bzw. 890C nach der Filmtechnik. Die Konvertierung der einzelnen Schritte wurde per Hand durchgeführt.
Folgende Sequencersubstanzen wurden verwendet:
5% Phenylisothiocyanat (PITC) in Heptan (Beckman, sequencergrade)
1M Quadrol (N,N,N,N-Tetrakis (2-hydroxypropyl) äthylendiamin) in n-Propanol:Wasser 3:4 mit Trifluoressigsäure auf pH 9 gebracht für den Sequencer 890C

1,25M Diäthylamino-1-propin-Puffer in n-Propanol:Wasser
pH 9 für den Sequencer 890B
Benzol (wasserfrei, p.a.)
Buthylchlorid
Essigester
Die letzten beiden Chemikalien wurden durch Destillation und über Aktivkohle gereinigt sowie über Aluminiumoxid aldehydfrei gemacht.
Je nach erwünschter Schrittzahl wurden für einen Sequencerlauf zwischen 0,5 und 1,0 µMol Protein (Peptid) eingesetzt.
Die Sequenzierung der kleineren und/oder hydrophoben Peptide erfolgte im Sequencer 890B mit vom Originalprogramm (Beckman) abweichenden Programm (120), das durch wesentlich kürzere Waschzeiten mehr abbauschritte ermöglicht.
Im Sequencer 890C, mit dem hauptsächlich Proteinketten und lange Peptide sequenziert wurden, kam ein ebenfalls modifiziertes Proteinprogramm der Fa. Beckman zur Anwendung. Durch eine 10 Min. ausgedehnte Lösungsphase im Quadrolpuffer vor der Zugabe des PITC wurden N → O Acylshifts wesentlich unterdrückt. Diese N → O Acylshifts treten zum Teil bei Ser- und Thr-Peptidbindungen auf und führen nach Anlagerung des PITC an die freigewordenen Aminogruppen zu Spaltungen C-terminal von Ser und Thr.

V.24. Identifizierung der PTH-Aminosäuren

Die Identifizierung der PTH-Aminosäuren erfolgte hauptsächlich durch Dünnschichtchromatographie, teilweise aber auch durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie im HPLC (hp 1084 B Liquid Chromatograph der Fa. Hewlett-Packard).
Zur Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator (Merck, DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254}, 20 x 20 cm x 0,25 mm) verwendet. Auf der Platte wurden abwechselnd die Abbauschritte und Referenzgemisch getüpfelt.
Die Entwicklung der PTH-Aminosäuren erfolgte in folgenden Systemen:

1. tert.-Butylpropionat
2. 1,2-Dichloräthan:Essigsäure 60:14
3. Essigester:Methanol:Essigsäure:1,2-Dichloräthan 10:50:2:38

Nach jedem Entwicklerlauf wurden die Platten bei 80°C getrocknet und im UV-Durchlicht bei 254 nm fotographiert. Die PTH-Aminosäuren löschen die Fluoreszenz aus.

Nur in Fällen, in denen keine eindeutige Identifizierung möglich war, wurde die Hochdruckflüssigkeitschromatographie verwendet.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1 K.Hilse, U.Sorger & G.Braunitzer (1966), Hoppe-Seyler's Zeitschr. Physiol.Chem., 344, 166-168

2 G.Braunitzer & U.Sorger (1969), Hoppe-Seyler's Zeitschr. Physiol.Chem.,350, 405-406

3 B.Grujić-Injac, G.Braunitzer & A.Stangel (1980), Hoppe-Seyler's Zeitschr. Physiol. Chem., 361, 1629-1639

4 G.Braunitzer, R.Gehring-Müller, N.Hilschmann, K.Hilse, G.Hobom, V.Rudloff & B.Wittmann-Liebold (1961), Hoppe-Seyler's Zeitschr. Physiol. Chem., 325, 283-286

5 K.Hilse & G.Braunitzer (1968), Hoppe-Seyler's Zeitschr. Physiol. Chem., 349, 433-450

6 W.C.Mahoney & M.A.Hermodson (1979), Biochem., 18, 3810 - 3814

7 E.Gross & B.Wittkop (1961), J.Am.Chem.Soc., 83, 1510-1511

8 A.M.Vaccaro, R.Raschetti, G.Ricciardi and G.Morpurgo (1975) Comp. Biochem. Physiol., 52A, 627-634

9 A.M.Vaccaro Torracca, R.Raschetti, R.Salvioli, G.Ricciardi K.H.Winterhalter (1977), Biochem. Biophys. Acta, 496 367-373

10 W.Konigsberg and R.J.Hill (1962) J.Biol.Chem. 327, 3157 - 3162

11 G.Braunitzer, N.Hilschmann, V.Rudloff, K.Hilse, B.Liebold & R.Müller (1961), Nature (London), 190, 480-482

12 M.F.Perutz, H.Muirhead, J.M.Cox, L.C.G.Goaman (1968) Nature (London), 219, 131-139

13 W.Bolton and M.F.Perutz (1970), Nature, 228, 551-552

14 M.F.Perutz and L.F.Teneyek (1971) Cold.Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 36, 295-310

15 M.F.Perutz (1970), Nature, 228, 726-739

16 G.Fermi (1975) J.Mol.Biol., 97, 237-256

17 M.F.Perutz, J.V.Kilmartin, K.Nishikura, J.H.Fogg, P.J.G. Butler (1980), J.Mol.Biol., 138, 649-670

18 A.Arnone (1972), Nature (London), 237, 146-149

19 A.Arnone (1974), Nature (London), 247, 143-147

20 M.F.Perutz, J.E.Ladner, S.R.Simon and C.Ho (1974) Biochemistry, 13, 2163-2174

21 M.F.Perutz, A.R.Fersht, S.R.Simon and G.C.K.Roberts (1974) Biochemistry, 13, 2174-2186

22 J.C.W.Chien, L.C.Dickinson, F.W.Snyder jr. and K.H.Mayo (1980) J.Mol.Biol., 142, 75-91

23 C.L.Hamilton and H.M.McConnell (1968) In "Structural chemistry and Molecular Biology" (A.Rich and M.Davidson eds.) S. 115-152, W.H.Freeman and Co, San Francisco

24 U.E.H.Fyhn, H.J.Fyhn, B.J.Davis, D.A.Powers, W.L.Fynk and R.L.Garlick (1979) Comp.Bioch.Physiol., 62A, 39-66

25 C.Phelps, M.Farmer, H.J.Fyhn, U.E.H.Fyhn, R.L.Garlick, R.W.Noble and D.A.Powers (1979), Comp.Bioch.Physiol., 62A, 139-143

26 J.Bonaventura, C.Bonaventura and B.Sullivan (1975) J.Exp.Zool., 194, 155-174

27 R.E.Weber, G.Lykkebo and K.Jahansen (1976), J.Exp.Biol. 64, 75-88

28 R.E.Weber, K.Johansen, G.Lykkeboe and G.M.O.Maloiy (1977) J.Exp.Zool., 199, 85-96

29 R.G.Delaney, C.Shub and A.P.Fishman (1976), Copeia No.3, 423-434

30 F.le R.Fourie and J.H.J.van Vuren (1976), Comp.Biochem. Physiol., 55B, 523-525

31 J.H.J.van Vuren and J.Hattingh (1978), Comp.Biochem. Physiol., 60, 265-268

32 M.Rizzotti, A. Comparini and E.Rodino (1977), Comp.Biochem. Physiol., 58A, 173-176

33 M.A.Giles and W.E.Vanstone (1976), J.Fisch.Res.Bd.Can. 33, 1144-1149

34 K.Johansen, G.Lykkeboe, R.E.Weber and G.M.O.Maloiy (1976) Respiration Physiology, 27, 335-345

35 H.A.Itano and S.J.Singer (1958), Proc.Natl.Acad.Sci.USA 44, 522-529

36 R.M.Macleod and R.J.Hill (1973), J.Biol.Chem.,248,100-103

37 H.F.Bunn and M.McDonough (1974),Biochem., 13, 988-993

38 N.P.Wilkins (1970), Biochem.Biophys.Acta, 214, 52-63

39 R.G.Gillen and A.Riggs (1973),Arch.Biochem.Biophys., 154, 348-359

40 P.A.Mied and D.A.Powers (1978), J.Biol.Chem., 253, 3521-3528

41 T.Shimady, Y.Okihama, T.Okazaki and R.Shukuya (1980) J.Biol.Chem., 255, 7912-7917

42 R.G.Gillen and A.Riggs (1973), J.Biol.Chem., 248, 1961-1969

43 E.Reischl (1977), Comp.Biochem.Physiol., 58A, 217-221

44 G.Braunitzer und K.Rodewald (1980), Hoppe-Seyler's Zeitschr. Physiol, 361, 587-590

45 W.K.Fischer, A.R.Nasch and E.O.P.Thompson (1977), Austr. J.Biol.Sci, 30, 487-506

46 D.A.Powers and A.B.Edmundson (1972), J.Biol.Chem.,247, 6694-6707

47 A.R.Nash, W.K.Fischer and E.O.P.Thompson (1976), Austr. J.Biol.Sci., 29, 73-97

48 F.Bossa, D.Barra, R.Petruzze, F.Martini and M.Brunori (1978), Bioch.Biophys.A., 536, 298-305

49 F.Bossa, D.Barra, M.Coletta, F.Martini, A.Liverzani, R.Petruzelli, J.Bonaventura and M.Brunori (1976), Febs Letters, 64, 76-80

50 J.P.Boissel, H.Wajcman and D.Labie (1980), Eur.J.Biochem. 103, 613-621

51 M.Coates, B.Brimhall, P.Stenzel, M.Hermodson, D.Gibson, R.T.Jones and T.Vedvick (1977), Aust.J.Biol.Sci., 30, 1-19

52 M.Flavin, Y.Blouquit and J.Rosa (1976), Febs Letters, 67, 52-57

53 J.Bonaventura, R.G.Gillen and A.Riggs (1974), Arch.Biochem.Biophys., 163, 728-734

54 D.A.Powers and A.B.Edmunson (1972), J.Biol.Chem., 247, 6686-6693

55 T.O.Baldwin and A.Riggs (1974), J.Biol.Chem., 249,6110-6118

56 J.P.Chauvet and R.Acher (1972), Biochem.,11,916-927

57 M.Dayhoff and R.V.Eck (1969), in Atlas of Protein Sequence and Structure, S.D39-D61, National Biomed.Res. Found., Silver Spring, M.D., USA

58 H.Lehmann and P.A.M.Kynoch (1976), Human Hemoglobin Variants and their Characteristics, S.16-17, North-Holland Publishing Company Amsterdam, New York, Oxford
59 M.F.Perutz and H.Lehman (1968), Nature, 219, 902-909
60 F.Monod, F.Wiman and F.P.Changeux (1965), F.Mol.Biol. 12, 88-118
61 F.Perutz (1976), Br.Med.Bull., 32, 195-208
62 C.Bohr, K.Hasselbalch and A.Krogh (1904), Skand.Arch. Physiol., 16, 402
63 L.J.Henderson (1920), J.Biol.Chem., 41, 401
64 R.Root (1931), Biol.Bull., 61, 427-433
65 R.Fangë (1966), Physiol.Rev., 46, 299-322
66 R.W.Noble, L.J.Parkhurst and Q.H.Gibson (1970), J.Biol. Chem., 245, 6628-6633
67 B.Giardina, G.M.Giacometti, M.Coletta, M.Brunori, G. Giagometti and G.Rigatti (1978), Biochem.J., 175, 407-412
68 A.L.Tan and R.W.Noble (1973), J.Biol.Chem., 248, 7412-7416
69 C.Bauer, U.Engels, S.Paleus (1975), Nature, 256, 66-68
70 J.Piiper and D.Baumgarten-Schumann (1968), Resp.Physiol., 5, 326
71 H.Swan and F.G.Hall (1966), Am.J.Physiol.,210, 487-489
72 C.Lenfent and K.Johansen (1968), J.Exp.Biol.,49,437-452
73 C.Lenfent, K.Johansen and G.C.Grigg (1966), Respiration Physiology, 2, 1-21
74 M.Farmer, H.J.Fyhn, U.E.H.Fyhn and R.W.Noble (1979), Comp. Biochem. Physiol., 62A, 115-124
75 G.S.Carter (1931), Biol.Rev., 6, 1-35
76 E.N.Willmer (1934), J.Exp.Biol., 11, 283-306
77 G.R.Fish (1956), J.Exp.Biol., 33, 185-195
78 K.Johansen (1966), Comp.Biochem.Physiol., 18, 383-395
79 K.Johansen and C.Lenfant (1967), J.Exp.Biol.,46,205-218
80 K.Imai (1974), J.Biol.Chem., 249, 7607-7612
81 R.G.Gillen and A.Riggs (1972), J.Biol.Chem., 247,6039-6046
82 I.Binotti, S.Giovenco, B.Giardina, E.Antonini, M.Brunori and J.Wyman (1971), Arch.Biochem.Biophys., 142, 274-280
83 J.C.Chien and K.H.Mayo (1980), J.Biol.Chem.,255,9800-9806

84 A.Chanutin and R.R.Curnish (1967), Archs.Biochem. Biophys., 121, 96-102

85 R.Benesch and R.E.Benesch (1967), Biochem.Biophys.Res. Commun., 26, 162-167

86 R.Benesch, R.E.Benesch and C.I.Yu (1968), Proc.Natl.Acad. Sci., USA, 59, 526-532

87 A.Arnone (1974), An.Rev.Med., 25, 123-130

88 M.F.Perutz (1978), Scient.Am., 239, 92-125

89 S.Rapoport and G.M.Guest (1941), J.Biol.Chem., 138, 269-282

90 R.G.Gillen and A.Riggs (1971), Comp.Biochem.Physiol. 38B, 585-595

91 R.E.Weber, G.Lykkevoe and K.Johansen (1975), Liefe Sciences, 17, 1345-1350

92 A.J.Peterson and J.J.Poluhowich (1976), Comp.Biochem. Physiol., 55A, 351-354

93 K.V.Kaloustian and J.J.Poluhowich (1976), Comp.Biochem. Physiol., 53A, 245-248

94 R.E.Isaacks, H.D.Kim and D.R.Harkness (1978), Can.J.Zool. 56, 887-890

95 R.E.Weber and G.Lykkeboe (1978), J.Comp.Physiol.,128, 127-137

96 R.E.Isaacks, H.D.Kim and D.R.Harkness (1978), Can.J.Zool., 56, 1014-1016

97 R.E.Isaacks, H.D.Kim, G.R.Barlett and D.R.Harkness (1977) Life Sciencies, 20, 987-990

98 T.A.Borghese and R.L.Nagel (1978), J.Exp.Zool., 205, 133-140

99 R.E.Isaacks and D.R.Harkness (1980), Amer.Zool., 20, 115-129

100 S.C.Wood and K.Johansen (1972), Nature New Biol, 237, 278-279

101 R.E.Weber and S.C.Wood (1979), Comp.Bioch.Physiol., 62A, 179-184

102 R.E.Weber, S.C.Wood and B.J.Davis (1979), Comp.Bioch. Physiol., 62A, 125-130

103 S.C.Wood, K.Johansen and R.E.Weber (1975), Resp.Physiol. 25, 259-267

104 E.H.Colbert - "Die Evolution der Tiere" - (1965), Gustav Fischer Verlag Stuttgart, S.58

105 Drabkin (1946), F.Biol.Chem., 164, 703-723

106 R.K.Cannan (1958), Science, 127, 1376-1378

107 A.Rossi-Fanelli, E.Antonini (1958), Biochem.Biophys.Acta 30, 608-619

108 L.Ornstein (1964), Ann.N.Y.Acad.Sci., 121, 321-349

109 V.Macko und H.Stegemann (1969), H-S.Zeitschr.Physiol.Chem. 350, 917-919

110 H.Stegemann, H.Francksen, V.Macko (1973), Zeitschr. Naturforsch., 28C, 722-732

111 A.M.Crestfield, S.Moore, W.H.Stein (1963), F.Biol.Chem., 238, 622

112 J.Jauregui and J.Marti (1975), Anal.Biochem., 69,468-473

113 C.H.W.Hirs (1967), Methods Enzymol.,Vol.XI, 218

114 D.H.Spackman, W.H.Stein and S.Moore (1958), Anal.Chem., 30, 1190-1206

115 H.Matsubara, R.M.Sasaki, R.K.Chain (1967), Proc.Natl.Acad. Sci., 57, 439

116 C.W.Hirs (1956), J.Biol.Chem., 219, 611-621

117 P.Edman (1950), Acta Chem.Scand., 4, 277-293

118 P.Edman and G.Begg (1967), Eur.J.Biochem., 1, 80-91

119 P.Edman and A.Henschen (1975), "Protein Sequence Determination" in Molecular Biology,Biochemistry and Biophysics, Vol.8, Ed.by S.B.Needleman Springer Verlag, S.232-279

120 G.Braunitzer, B.Schrank (1970), H-S.Zeitschr.Physiol. Chem., 351, 417-418

Z U S A M M E N F A S S U N G

Die Erythrozyten des Goldfisches und des Lungenfisches enthalten nur je eine tetramere Hämoglobin-Komponente. Der Blutfarbstoff des Goldfisches hat dieselbe elektrophoretische Mobilität wie die Komponente "c" des Karpfens. Bei den α-Ketten ist der N-Terminus mit Acetyl blockiert. Das Hämoglobin des Lungenfisches besteht aus drei Ketten: α , β_A und β_B; die β_B-Ketten haben einen blockierten N-Terminus. Die Bruttoformel dieses Hämoglobins ist: $\alpha_2\beta_A\beta_B$. In dieser Arbeit wurden die Primärstrukturen der α- und ß-Ketten des Goldfisches und der α und β_A-Ketten des Lungenfisches aufgeklärt.
Infolge des hohen Cystein-Gehaltes der ß-Ketten des Goldfisches bereitete die Kettentrennung nach der Standard-Chromatographie an CM-Cellulose in 8M Harnstoff gewisse Probleme. Für die Darstellung reiner α-und ß-Ketten des Goldfisches wurde die Luftoxydations-Methode angewendet.
Die Ketten des Lungenfisches konnten als carboxymethylierte Derivate mit Austauscherchromatographie und Salz-Gradienten an DEAE-Sephacel gewonnen werden.
Die Sequenz der einzelnen Ketten wurde mit unterschiedlichen Spaltungs- und Isolierungsmethoden erarbeitet. Da die heutige Technik die Sequenzierung großer Peptide ermöglicht, wurde die Spaltung in kleine Bruchstücke nur beschränkt verwendet.
Die blockierende Gruppe des N-Terminus sowie auch die Sequenz des N-terminalen Peptids der α-Ketten des Goldfisches konnten nur nach einer chymotryptischen Spaltung des Tp1(a+b) und mit Hilfe der Massenspektrometrie bestimmt werden. In den α-Ketten des Lungenfisches konnten im C-terminalen Bereich zwei Aminosäuren nicht eindeutig identifiziert werden.
Beim homologen Vergleich der Ketten beider Fische mit den Human- und anderen Fischketten wurden die Unterschiede diskutiert. Für die tetrameren Fischhämoglobine liegt noch keine Röntgenstrukturanalyse vor. Die experimentellen Daten der Struktur dieser Fischhämoglobine wurden diskutiert: es wurden erste Beziehungen zur Physiologie und Raumstruktur des Moleküls angegeben.

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, unter der Leitung von Prof. Dr. G. Braunitzer von Oktober 1978 bis September 1980 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer danke ich für die großzügige Unterstützung und Förderung.

Mein Dank gilt ferner allen Angehörigen der Abteilung Protein Chemie, die mir mit Rat und Tat und Geduld zur Seite standen und meiner Tätigkeit Verständnis entgegenbrachten.

Frau Dr. T. Kleinschmidt danke ich besonders für die äußerst kollegialen und fruchtbaren Anregungen und Diskussionen sowie auch für die Durchsicht dieser Arbeit.

Frau Dr. G. Mazur und Frau B. Stern danke ich für die sprachliche Korrektur dieser Arbeit.

Fräulein B. Schrank, Fräulein H. Mairhofer, Herrn C. Krombach, Herrn A. Stangl, Frau C. Felsmann danke ich für die ausgezeichnete technische Hilfe.

Der Fritz-Thyssen-Stiftung und der Humboldt-Stiftung danke ich für die Gewährung eines Stipendiums.

Der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für das Doktoranden-Stipendium.

L E B E N S L A U F

Am 7. Dezember 1941 wurde ich als Tochter des Direktors des Fischinstitutes Dr. Ludwig Rodewald-Rudescu und seiner Ehefrau Maria-Josefa in Tulcea, Rumänien, geboren.
Von 1947 bis 1953 besuchte ich die Volksschule, von 1953 bis 1959 das Gymnasium in Bukarest, an dem ich im Juni 1959 das Abitur ablegte. Das 1959 begonnene Studium der Chemie an der Universität "Bukarest" in Bukarest schloß ich 1964 mit der Diplomprüfung ab.
Von August 1964 bis August 1977 war ich als Chemikerin am Institut für Mikrobiologie und Parasitologie "Dr.J.Cantacuzino" in Bukarest tätig.
Von 1968 bis 1974 war ich Doktorandin bei Prof. Dr. Oeriu, Institut für Biochemie und Fakultät für Biochemie, Bukarest. 1968 wurde mir ein Sonderstipendium der Fritz-Thysse-Stiftung durch die Humboldt-Stiftung gewährt. Dieses Stipendium sollte mir die Anfertigung einer Doktorarbeit in Proteinsequenzierung ermöglichen. Die Ausreise wurde mir aber erst 1977 gestattet.
Im September 1977 bin ich im Rahmen der Familienzusammenführung aus Rumänien ausgewandert. Heute besitze ich die deutsche Staatsangehörigkeit.
Von September 1977 bis September 1979 war ich als Stipendiantin bei Prof. Dr. G. Braunitzer am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, tätig.
Von Oktober 1979 bis April 1981 habe ich diese Arbeit mit einem Doktorandenstipendium der Max-Planck-Gesellschaft fortgeführt. Diese Stipendien ermöglichten die Durchführung der vorliegenden Doktorarbeit. Am 28. November 1980 habe ich geheiratet.